

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293477 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.08

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.14

(54) БИСПЕЦИФИЧНОЕ АНТИТЕЛО К α -SYN/IGF1R И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 10-2017-0172205; 62/693,474;
62/734,391; 62/734,388

(72) Изобретатель:
Ан Чжинхён, Ан Сонвон, Ким Донин,
Сон Ынсил, Ом Джехён, Ли Сан Хун,
Ю Вонкю, Ким Джухи, Пак Кёнджин,
Чон Хёчжин, Чон Джинвон, Ли Бора,
Сон Бёндже, Ким Ёнчжу, Сон Ён-
Гю, Ан Сэвон, Сон Дэхе, Ю Джисон,
Пак Ёндон, Ём Донхун, Ли Ёсон, Чон
Джехо (KR)

(32) 2017.12.14; 2018.07.03; 2018.09.21;
2018.09.21

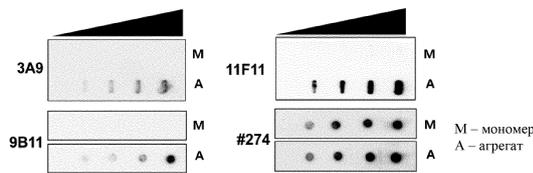
(33) KR; US; US; US

(62) 202091183; 2018.12.14

(71) Заявитель:
ЭЙБИЭЛ БИО ИНК. (KR)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Изобретение относится к биспецифичному антителу, специфично связывающемуся с α -синуклеином и IGF1R, и к применению указанного биспецифичного антитела в предотвращении, лечении и/или диагностике α -синуклеинопатий, представляющих собой заболевания, связанные с α -синуклеином или его агрегатами. В настоящем изобретении антитело к α -syn или его антигенсвязывающий фрагмент могут проходить через гематоэнцефалический барьер и оказывать свое действие в головном мозге, а период их полувыведения увеличен, благодаря чему они могут сохранять свою медицинскую эффективность на протяжении длительного периода времени.



A1

202293477

202293477

A1

БИСПЕЦИФИЧНОЕ АНТИТЕЛО К А-SYN/IGF1R И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к биспецифичному антителу против альфа-синуклеина и IGF1R, к фармацевтической композиции для предотвращения и/или лечения синуклеинопатий (α -синуклеинопатий), содержащей указанное биспецифичное антитело, и к способу выявления агрегатов альфа-синуклеина или предоставления информации для диагностики альфа-синуклеинопатий, включающему указанное биспецифичное антитело.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Альфа-синуклеин (α -синуклеин, α -syn) экспрессируется преимущественно в пресинаптических окончаниях нейронов и в нормальных условиях представляет собой естественным образом развернутый мономер. Альфа-синуклеин способствует регуляции высвобождения дофамина, который является нейромедиатором, контролирующим произвольные или непроизвольные движения. В частности, функция альфа-синуклеина важна при повышении синаптической активности и старении и является важным фактором нейродегенерации.

Тем не менее, в патологическом состоянии альфа-синуклеин претерпевает структурные изменения посредством связывания и взаимодействия с каплями, фосфолипидными бислоями или липидными мембранами с образованием свернутой или свернутой α -спиральной вторичной структуры, в результате чего его количество кратно уменьшается. Образуются агрегаты, содержащие молекулы в форме димеров, олигомеров и/или волокон.

Известно, что эти агрегаты альфа-синуклеина оказывают токсическое действие на клетки и являются основным компонентом аномальных белковых агрегатов телец Леви, обнаруженных в нейронах при болезни Паркинсона (БП), деменции при болезни Паркинсона (ДБП), мультисистемной атрофии (МСА), деменции с тельцами Леви (ДТЛ) и различных заболеваниях. Также известно, что посттрансляционные модификации альфа-синуклеина, такие как фосфорилирование или убиквитинирование, также ассоциированы с образованием агрегатов альфа-синуклеина и их нейротоксичностью. Известно, что альфа-синуклеин приводит к гибели дофаминовых нейронов, индуцирует воспалительные реакции в экспериментах на животных и клетках и вызывает двигательные симптомы, сходные с болезнью Паркинсона, у

экспериментальных животных. Кроме того, известно, что образование агрегатов альфа-синуклеина связано с этиологией группы нейродегенеративных заболеваний, называемых α -синуклеинопатиями, включая болезнь Паркинсона, деменцию при болезни Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, мультисистемную атрофию и многие другие нейроаксональные заболевания.

В качестве методов иммунотерапии синуклеиновых заболеваний были предложены антитела к альфа-синуклеину или фрагменты альфа-синуклеина для индукции таких антител. Однако проникновение антител в головной мозг может быть ограничено гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ).

Кроме того, дефицит высоко специфичных переносчиков через ГЭБ привел к задержке разработки новых терапевтических и диагностических средств для лечения и диагностики заболеваний, возникающих в головного мозга, включая опухоли головного мозга и нейродегенеративные заболевания. Существует отчетливая потребность в способе доставки терапевтических и диагностических молекул в фармацевтически эффективной дозе в головной мозг без нарушения физиологии и гомеостаза ГЭБ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Техническая проблема

Согласно одному воплощению настоящего изобретения предложен белковый комплекс, содержащий антигенсвязывающую область против альфа-синуклеина (α -Syn) и антигенсвязывающую область против IGF1R, или способ получения указанного белкового комплекса.

Согласно другому воплощению предложен полинуклеотид, кодирующий указанный белковый комплекс, рекомбинантный вектор, содержащий указанный полинуклеотид, и рекомбинантная клетка, содержащая указанный рекомбинантный вектор.

Согласно другому воплощению предложено биспецифичное антитело против α -Syn и IGF1R, полученное из указанного белкового комплекса, и способ получения указанного биспецифичного антитела.

Согласно другому воплощению предложена фармацевтическая композиция для предотвращения и/или лечения альфа-синуклеинопатий, содержащая указанное биспецифичное антитело против α -Syn и IGF1R и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Предложен способ доставки лекарственных средств, применяемых для диагностики, лечения или предотвращения альфа-синуклеинопатий, в головной мозг с использованием антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению.

Техническое решение

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно.

Одно воплощение настоящего изобретения представляет собой белковый комплекс, содержащий антигенсвязывающую область для альфа-синуклеина (α -Syn) и антигенсвязывающую область для IGF1R, и биспецифичное антитело против альфа-синуклеина и IGF1R (далее — биспецифичное антитело против α -Syn / против IGF1R), полученное из указанного белкового комплекса. Таким образом, биспецифичное антитело по настоящему изобретению может распознавать и связывать, в качестве антигенов, как альфа-синуклеин, так и IGF1R.

Биспецифичное антитело против α -Syn / против IGF1R по настоящему изобретению содержит антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент и специфично распознает и связывается с альфа-синуклеином, в особенности с С-концевой областью альфа-синуклеина, благодаря чему его используют для предотвращения, лечения и/или диагностики заболеваний, связанных с альфа-синуклеином или агрегатами альфа-синуклеина, то есть альфа-синуклеинопатий.

Согласно настоящему изобретению, термин «синуклеинопатии» включает все нейродегенеративные расстройства, характеризующиеся патологическими агрегатами синуклеина. В общую группу синуклеинопатий включают болезнь Паркинсона, деменцию при болезни Паркинсона (ДБП), деменцию с тельцами Леви (ДТЛ), болезнь телец Леви, деменцию, сопровождающуюся тельцами Леви, синдром Паркинсона с деменцией, мультисистемную атрофию (МСА), множественную атрофию нервной системы и нейродегенерацию I типа с накоплением железа в головном мозге (NBIA I типа). Кроме того, агрегаты альфа-синуклеина также были вторично обнаружены при болезни Альцгеймера (Kim et al. *Alzheimer's Research & Therapy* 2014, 6:73).

Синуклеинопатии представляют собой разнородную группу нейродегенеративных расстройств со сходными патологическими признаками. В нейрпатологическом аспекте, можно обнаружить отчетливые очаги в форме аномальных агрегатов альфа-синуклеина в отдельных группах нейронов и

олигодендроцитов. Альфа-синуклеин (ранее известный как PARK1 и PARK4) представляет собой белок, содержащий 140 аминокислот, который широко экспрессируется в неокортексе, гиппокампе, зубчатой извилине, задней нейросфере, полосатом теле, таламусе и мозжечке. Экспрессия альфа-синуклеина также высока в кроветворных клетках, включая моноциты, такие как В-клетки, Т-клетки, НК-клетки и тромбоциты. Его точная роль в этих клетках неизвестна, но она связана с дифференцировкой мегакариоцитов (предшественников тромбоцитов).

В настоящем описании «заболевание, ассоциированное с агрегатами альфа-синуклеина», представляет собой группу нейродегенеративных заболеваний, называемых синуклеинопатиями, с агрегатами альфа-синуклеина в патологических очагах, включая нейроны и глию, и такими характеристиками, как дегенерация дофаминовой системы, изменения двигательных функций, расстройство когнитивных функций и образование телец Леви и/или нейритов Леви (Kim et al. *Alzheimer's Research & Therapy* 2014, 6:73; McKeith et al., *Neurology* (1996) 47:1113-24). Эти заболевания включают, без ограничения, болезнь Паркинсона, деменцию при болезни Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, вариант болезни Альцгеймера с тельцами Леви, сочетание болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона, мультисистемную атрофию и многие другие нейроаксональные заболевания. В одном воплощении антитело по настоящему изобретению эффективно используют для лечения болезни Паркинсона.

Кроме того, биспецифичное антитело против α -Syn / против IGF1R по настоящему изобретению содержит антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент, благодаря чему антитело против α -Syn или его антигенсвязывающий фрагмент могут проникать через гематоэнцефалический барьер для оказания своего действия и имеют большой период полувыведения, сохраняя эффективность на протяжении длительного времени.

Более того, биспецифичное антитело против α -Syn / против IGF1R по настоящему изобретению связывается с IGF1R на поверхности клеток, не влияя на его связывание с лигандом, и не оказывает влияния на сигнальный путь IGF1R. Поскольку оно не ингибирует связывание IGF1R с его лигандом и передачу сигналов через IGF1R, оно может быть использовано в качестве переносчика для проникновения через гематоэнцефалический барьер.

В частности, антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению специфично распознают IGF1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1-го типа) и связываются с IGF1R, в частности с человеческим IGF1R, мышинным IGF1R, крысиным IGF1R и IGF1R обезьяны. Тем не менее, они не препятствуют связыванию лигандов IGF1R, таких как IGF-1, IGF-2 и/или инсулин, с IGF1R, не ингибируют передачу сигналов через IGF1R и могут быть использованы для транцитоза с целью прохождения через ГЭБ. Они не обладают антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC) и, таким образом, не снижают уровни IGF1R в головном мозге даже при их многократном введении животным, благодаря чему они нетоксичны.

В частности, антитело против IGF1R по настоящему изобретению связывается с IGF1R, расположенным на поверхности эндотелиальных клеток головного мозга, образующих ГЭБ, и проходит интернализацию, проникая во внутреннюю часть клетки. Например, интернализацию антитела против IGF1R по настоящему изобретению клетками можно выявить с использованием клеточной линии, экспрессирующей IGF1R (например, MCF-7). Антитела против IGF1R по настоящему изобретению, например, 1564, 48G5, 54H4, 60H6, B11 и аффинные варианты 1564, такие как C04, F06, VH2, VH5, VH7, VH9, VH16, VH32 и VH35, имеют более высокую степень интернализации по сравнению с отрицательным контролем. Полученные результаты показывают, что степень интернализации проанализированных антител против IGF1R специфична относительно IGF1R на поверхности клеток. Кроме того, антитело против IGF1R по настоящему изобретению имеет форму scFv и может быть получено связанным с терапевтическим антителом различными способами. Например, scFv антитела против IGF1R может быть получен в составе биспецифичного антитела, например, бивалентной формы биспецифичного антитела, где с С-концом терапевтического антитела, например, антитела к α -syn, связаны два scFv, или моновалентной формы биспецифичного антитела, где с С-концом терапевтического антитела связан один scFv. Оба из этих биспецифичных антител могут быть интернализированы клетками, экспрессирующими IGF1R. Антитело к IGF1R имеет высокую аффинность связывания с антигеном на поверхности клеток, что усиливает эффект интернализации и приводит к способности проходить через ГЭБ. Тем не менее, если антитело обладает способностью проходить через ГЭБ и препятствует передаче сигналов через IGF1R, оно может вызывать побочные эффекты. Антитело по настоящему изобретению

характеризуется как связывающей способностью, подходящей для прохождения через ГЭБ, так и отсутствием блокировки передачи сигналов через IGF1R.

Антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент обладают отличным свойством простоты их разработки. В этом аспекте, посттрансляционные модификации, такие как дезамидирование, происходящие в области CDR антитела против IGF1R и снижающие стабильность и эффективность антитела, должны быть устранены. Замена аминокислоты, по которой происходит дезамидирование, позволяет повысить стабильность и эффективность антитела по сравнению с исходным антителом без изменения способности к связыванию с ECD антигена IGF1R. Заменяя Asn сайта дезамидирования на другие остатки, включая Q, H и K, один за другим, получают мутанты и сходство аффинности связывания мутантов с аффинностью исходного антитела подтверждают по результатам ELISA-анализа аффинности связывания мутантов с IGF1R.

Кроме того, при связывании с биологически активным веществом, действующим в головном мозге, антитело против IGF1R по настоящему изобретению может улучшать его способность к проникновению через ГЭБ и эффективность по сравнению с тем же биологически активным веществом самим по себе.

Антитело против IGF1R согласно одному аспекту настоящего изобретения может быть использовано как биспецифичное антитело, содержащее различные вторые терапевтические антитела. В эксперименте проникновения через *in vitro* ГЭБ-систему, имеющую происхождение от человеческих iPSC (Фиг. 16а), было показано, что по сравнению с одиночным антителом, состоящим только из терапевтического антитела, оно усиливает проникновение через ГЭБ в 15 раз. Антитело против IGF1R может быть связано со вторым антителом в биспецифичном антителе в моновалентной или бивалентной форме. Например, при анализе количества антитела в крови и СМЖ после однократного введения биспецифичного антитела с антителом против IGF1R в моновалентной форме или бивалентной форме нормальным крысам моновалентная форма и бивалентная форма антител против IGF1R продемонстрировали увеличение количества в крови до 5 раз и увеличение количества в СМЖ до 5 раз по сравнению с исходным антителом против IGF1R (клон 1564). Они продемонстрировали увеличение количества в СМЖ приблизительно в 3 раза и повышение проникновения в головной мозг приблизительно в 4,5 раза по сравнению с исходным антителом против IGF1R (клон 1564) (Фиг. 16с). Поэтому ожидается, что биспецифичное антитело, содержащее

антитело против IGF1R, усовершенствованное указанным выше способом, продемонстрирует увеличение количества антитела в СМЖ приблизительно до 15 раз и повысит его способность к проникновению в головной мозг приблизительно до 23 раз по сравнению с одиночным антителом, состоящим из второго терапевтического антитела самого по себе.

Было установлено, что антитело против IGF1R по настоящему изобретению связывается с IGF1R, в частности с IGF1R млекопитающих, включая людей, обезьян, крыс и мышей, и, таким образом, может быть полезным для скрининга при разработке лекарственных средств, для клинических исследований и тому подобного.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению представляют собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично распознающие IGF1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1-го типа).

Подразумевают, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению «специфично связываются» со своей мишенью, такой как антиген, когда они связываются с ней с константой диссоциации (K_D) 10^{-6} М или менее. Антитело специфично связывается с мишенью с высокой аффинностью, когда K_D составляет 1×10^{-8} М или менее или когда его средняя эффективная концентрация (EC_{50}) составляет 2 нМ или менее. В одном воплощении антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с IGF1R или человеческим IGF1R с K_D 1×10^{-8} или менее. Было обнаружено, что антитела, раскрытые здесь, связываются с IGF1R, особенно с человеческим IGF1R, мышинным IGF1R, крысиным IGF1R и IGF1R обезьяны.

При использовании здесь термин «эпитоп» представляет собой антигенную детерминанту, интерпретируемую как означающая часть антигена, распознаваемого антителом. Согласно одному воплощению, сайт связывания антитела против IGF1R по настоящему изобретению может представлять собой внеклеточный домен белка IGF1R, например, человеческого белка IGF1R (SEQ ID NO:99). Конкретнее, сайты связывания антитела против IGF1R по настоящему изобретению, например, клона 1564 антитела к человеческому белку IGF1R, представляют собой сайт связывания 1, содержащий Y775, P776, F778, R650, S791, L798 и Glu779, сайт связывания 2, содержащий L641, H808, E809 и L813, и сайт связывания 3, содержащий V397, D435, W434, Y460 и C488 в белке, состоящем из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:99. Таким

образом, эпитоп антитела к IGF1R по настоящему изобретению может представлять собой конформационный эпитоп, содержащий все или часть из этих трех сайтов связывания.

При использовании здесь термин «антитело» относится к веществу, полученному стимуляцией иммунной системы антигеном, и оно может, без ограничения, быть получено *in vivo*, получено рекомбинантным методом или синтезировано искусственно. В настоящем изобретении антитела включают антитела животных, химерные антитела, гуманизированные антитела и человеческие антитела. Кроме того, в настоящем изобретении антитело также включает антигенсвязывающий фрагмент антитела, обладающий антигенсвязывающей способностью.

Антитело также включает моноклональное антитело и поликлональное антитело, и моноклональное антитело может быть человеческим антителом, гуманизированным антителом или химерным антителом, представляющим собой выделенное антитело, специфично связывающееся с IGF1R. Моноклональное антитело представляет собой выделенное антитело типа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, связывающееся с IGF1R.

Антитела по настоящему изобретению включают, без ограничения, биспецифичные антитела, минитела, доменные антитела, миметики антител (или синтетические антитела), слитые антитела (или конъюгаты антител) и их фрагменты. Структура различных антител дополнительно раскрыта ниже.

При использовании здесь термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к части антитела или полипептиду, содержащему указанную часть, обладающим специфичной аффинностью связывания с антигеном. Например, часть антитела содержит аминокислотный остаток, обеспечивающий специфичность и аффинность в отношении антигена посредством взаимодействия с антигеном. Эта антигенсвязывающая область обычно содержит одну или более чем одну «определяющую комплементарность область (CDR)». Специфичная антигенсвязывающая область также содержит одну или более чем одну «каркасную область (FR)». CDR представляют собой аминокислотные последовательности, способствующие специфичности и аффинности связывания с антигеном. Каркасные области способствуют поддержанию подходящей конформации этих CDR, облегчая посредством этого связывание антигенсвязывающей области с антигеном.

В настоящем изобретении «определяющие комплементарность области (CDR)» обозначают области, придающие переменным областям антитела специфичность связывания с антигеном.

Антитело может быть выбрано из всех подтипов иммуноглобулинов (например, IgA, IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM и так далее). IgG-форма антитела может представлять собой антитело подтипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, например, подтипа IgG1 или IgG2. Антитело типа IgG содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, каждая тяжелая цепь и легкая цепь соединены дисульфидными связями с образованием двух димеров «тяжелая цепь – легкая цепь», и два образованных димера «тяжелая цепь – легкая цепь» соединены дисульфидной связью в Fc-области тяжелой цепи. IgG-форма антитела включает антитело к одной мишени, направленное на один антиген, где обе конструкции «тяжелая цепь – легкая цепь» содержат сайты связывания одного и того же антигена, или биспецифичное антитело, направленное на два антигена, где конструкции «тяжелая цепь – легкая цепь» содержат сайты связывания различных антигенов.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» цепи (тяжелой цепи или легкой цепи) антитела или иммуноглобулина включает часть антитела, которая не имеет некоторых аминокислот по сравнению с полноразмерной цепью, но может специфично связываться с антигеном. Этот фрагмент можно рассматривать как обладающий биологической активностью, в том аспекте, что он может специфично связываться с антигеном-мишенью или может конкурировать с другими антителами или антигенсвязывающими фрагментами за связывание с определенным эпитопом. Конкретно, антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из фрагментов антител, содержащих одну или более чем одну определяющую комплементарность область, таких как, без ограничения, scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' и F(ab')₂. Такие биологически активные фрагменты могут быть получены технологией рекомбинантных ДНК или могут быть получены ферментативным или химическим расщеплением интактных антител. Иммунологически функциональные фрагменты иммуноглобулинов не ограничены указанными фрагментами.

В настоящем изобретении, например, «вариант» полипептида, такого как антигенсвязывающий фрагмент, белок или антитело, представляет собой полипептид, в котором присутствует вставка, делеция, присоединение и/или замена одного или более чем одного аминокислотного остатка по сравнению с другими полипептидными

последовательностями, и включает слитые полипептиды. Например, некоторые антитела содержат консервативные аминокислотные замены одного или более чем одного остатка тяжелой или легкой цепи, вариабельной области или последовательности CDR.

Термин «производное» полипептида в настоящем изобретении обозначает полипептид, химически модифицированный посредством конъюгации с другими химическими группировками и отличный от вариантов с вставками, делециями, присоединениями или заменами.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению не предотвращают связывание лигандов IGF1R, таких как IGF-1, IGF-2 и/или инсулин, с IGF1R. Конкретно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R обеспечивают преимущество, состоящее в том, что они не препятствуют связыванию лиганда IGF1R с IGF1R, расположенным на мембране клеток, экспрессирующих IGF1R, а также не ингибируют передачу сигналов через IGF1R и не влияют на экспрессию IGF1R на поверхности клеток. Таким образом, антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению могут быть эффективно использованы для проникновения через гематоэнцефалический барьер посредством трансцитоза.

Человеческий IGF1R может быть активирован инсулиноподобными факторами роста IGF-1 и IGF-2 и инсулином (INS). Передача сигналов через IGF1R стимулирует рост и выживание клеток через адаптерный белок IRS, от которого зависит активация пути PI3-киназы/Akt. IGF1R передает сигналы своим основным субстратам IRS-1, IRS-2, IRS-3 и IRS-4 и белкам Shc, что приводит к активации сигнальных путей Ras/Raf/MAP-киназы и PI3-киназы/Akt. Было показано, что IGF1R имеет относительно высокий уровень экспрессии в головном мозге по сравнению с другими мишенями для трансцитоза, экспрессия которых подтверждена в эндотелиальных клетках головного мозга, используемыми в настоящее время для повышения способности к проникновению через ГЭБ.

Антитело против IGF1R по настоящему изобретению не препятствует связыванию IGF1, IGF2 и/или инсулина с IGF1R и не препятствует передаче сигналов через путь IGF1R, как описано выше. Кроме того, в одном воплощении настоящего изобретения, при сравнении IGF1R с другими мишенями, разрабатываемыми в настоящее время с целью повышения способности терапевтических антител к

проникновению через ГЭБ, например, рецептором трансферрина или рецептором инсулина, было показано, что он имеет относительно низкий уровень экспрессии в нормальном головном мозге и периферических тканях, таких как печень, легкие или толстая кишка.

IGF1R является мишенью при рецептор-опосредованном трансцитозе (RTM), позволяющем доставлять полезные вещества через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в головной мозг. Однако для его использования в качестве мишени при доставке лекарственных средств посредством их проникновения через гематоэнцефалический барьер желательна связывание с IGF1R на поверхности клеток без влияния на его связывание с лигандом и передачу сигналов через путь IGF1R. Поэтому антитело против IGF1R и его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению не ингибируют связывание IGF1R с его лигандом и передачу сигналов через IGF1R, благодаря чему они могут быть использованы в качестве переносчиков для проникновения через гематоэнцефалический барьер.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению способны к трансцитозу и могут проходить через эндотелиальные клетки головного мозга. Кроме того, после его введения в кровеносный сосуд мышцы антитело по настоящему изобретению локализуется в том же месте, что и кровеносные сосуды головного мозга мышцы. Эти результаты показывают, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть эффективно использованы в качестве носителя лекарственного средства, который проходит через гематоэнцефалический барьер.

Таким образом, антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению позволяют биологически активному веществу, действующему в головном мозге, проходить через гематоэнцефалический барьер. В настоящем изобретении биологический барьер относится к клеткам, тканям, мембранам или клетке, мембране или структуре, предотвращающим эффективное прохождение, диффузию или перенос биологической молекулы. Эти биологические барьеры включают нервные клетки/ткани, соединительную ткань, мышцы, мембраны или эпителиальные клетки (например, слизистых оболочек или сосудов). Типичным примером является гематоэнцефалический барьер.

В настоящем изобретении термин «гематоэнцефалический барьер» или ГЭБ представляет собой барьер, образованный плотными контактами в эндотелиальной

мембране капилляров головного мозга, который отделяет головной мозг и спинной мозг от окружающей их кровеносной системы. Этот барьер настолько сильный, что он ограничивает прохождение в головной мозг даже тех молекул, молекулярная масса которых мала и составляет приблизительно 60 Да. Гематоэнцефалический барьер головного мозга, сосудистый барьер спинного мозга и сосудистый барьер сетчатки представляют собой непрерывные капиллярные барьеры центральной нервной системы, и их обычно обозначают как ГЭБ.

В настоящем изобретении «переносчик через гематоэнцефалический барьер» может проходить через гематоэнцефалический барьер и обеспечивать доставку антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению и, например, включает белок, в том числе пептид и полипептид, нуклеиновую кислоту, антитело или низкомолекулярное соединение.

Получение и отбор антител по настоящему изобретению могут быть проведены в трансгенных мышах, например, описанных выше, где мышам вводят ген, кодирующий антиген-специфичные человеческие mAb с желаемой специфичностью с применением гибридомной технологии. Такие антитела могут быть клонированы и экспрессированы с использованием подходящих векторов и клеток-хозяев, или антитела могут быть получены из культивированных гибридомных клеток. Кроме того, антитело может иметь происхождение от фаговой дисплейной библиотеки. Технология фагового дисплея представляет собой метод, имитирующий, в некоторой степени, иммунный отбор посредством селекции репертуара антител на поверхности нитчатых бактериофагов и отбора из них тех фагов, которые связываются с желаемым антигеном. Такая методика может относиться к воплощению настоящего изобретения или РСТ-публикации № WO 1999/010494. В одном воплощении отбор гуманизированного антитела к IGF1R по настоящему изобретению проводят методом фагового дисплея.

Настоящее изобретение относится к выделенному антителу или антигенсвязывающему фрагменту, специфично связывающимся с IGF1R, которые могут представлять собой полипептид, белок, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающиеся с IGF1R, содержащие определяющие комплементарность области тяжелой цепи и определяющие комплементарность области легкой цепи.

Далее это описано конкретно для антител, специфично связывающихся с IGF1R.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент против IGF1R по настоящему изобретению специфично распознают IGF1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1-го типа), распознают и связываются с IGF1R, в частности с человеческим IGF1R, мышинным IGF1R, крысиным IGF1R и IGF1R обезьяны, не препятствуют связыванию IGF1R, IGF-1R, IGF-2 и/или инсулина с IGF1R, не ингибируют передачу сигналов через IGF1R и могут быть использованы для трансцитоза с целью прохождения барьера в крови. Они не обладают антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC) и не снижают уровни IGF1R в головном мозге даже при их многократном введении животным.

В частности, антитело против IGF1R по настоящему изобретению связывается с IGF1R, расположенным на поверхности эндотелиальных клеток головного мозга, образующих ГЭБ, и проходит интернализацию, проникая во внутреннюю часть клетки. Например, интернализацию антитела против IGF1R по настоящему изобретению клетками можно выявить с использованием клеточной линии, экспрессирующей IGF1R (например, MCF-7). Антитела против IGF1R по настоящему изобретению, например, 1564, 48G5, 54H4, 60H6, B11 и аффинные варианты 1564, такие как C04, F06, VH2, VH5, VH7, VH9, VH16, VH32 и VH35, имеют более высокую степень интернализации по сравнению с отрицательным контролем. Полученные результаты показывают, что степень интернализации проанализированных антител против IGF1R специфична относительно IGF1R на поверхности клеток. Кроме того, антитело против IGF1R по настоящему изобретению имеет форму scFv и может быть получено связанным с терапевтическим антителом различными способами. Например, scFv антитела против IGF1R может быть получен в составе биспецифичного антитела, например, бивалентной формы биспецифичного антитела, где с С-концом терапевтического антитела, например, антитела к α -syn, связаны два scFv, или моновалентной формы биспецифичного антитела, где с С-концом терапевтического антитела связан один scFv. Биспецифичные антитела могут быть интернализированы клетками, экспрессирующими IGF1R. Антитело к IGF1R имеет высокую способность к связыванию с антигеном на поверхности клеток, что усиливает эффект интернализации и приводит к способности проходить через ГЭБ. Однако, если антитело обладает способностью проходить через ГЭБ и препятствует передаче сигналов через IGF1R, оно может вызывать побочные эффекты. Антитело по настоящему изобретению характеризуется как связывающей

способностью, подходящей для прохождения через ГЭБ, так и отсутствием блокировки передачи сигналов через IGF1R.

Настоящее изобретение относится к выделенному антителу или антигенсвязывающему фрагменту, специфично связывающимся с IGF1R, которые могут представлять собой полипептид, белок или антитело, специфично связывающиеся с IGF1R, содержащие определяющие комплементарность области тяжелой цепи и определяющие комплементарность области легкой цепи.

В конкретных примерах антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать:

(i) одну или более чем одну определяющую комплементарность область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, описанные в Таблице 1, или переменную область тяжелой цепи, содержащую указанную одну или более чем одну определяющую комплементарность область тяжелой цепи;

(ii) одну или более чем одну определяющую комплементарность область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, описанные в Таблице 1, или переменную область легкой цепи, содержащую указанную одну или более чем одну определяющую комплементарность область легкой цепи;

комбинацию одной или более чем одной определяющей комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и одной или более чем одной определяющей комплементарность области (CDR) легкой цепи; или

комбинацию переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи.

Кроме того, в указанных переменной области тяжелой цепи, переменной области легкой цепи или комбинации переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи переменная область тяжелой цепи может содержать одну или более чем одну каркасную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4, а переменная область легкой цепи может содержать одну или более чем одну каркасную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4.

(1) H-CDR1, H-CDR2 или H-CDR3 тяжелой цепи по настоящему изобретению выбраны из аминокислотных последовательностей, перечисленных в Таблице 1, или содержат по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, по существу идентичную выбранной аминокислотной последовательности. Кроме того, (ii) L-CDR1,

L-CDR2 или L-CDR3 легкой цепи выбраны из аминокислотных последовательностей, перечисленных в Таблице 2, или содержат одну или более чем одну аминокислотную последовательность, по существу идентичную выбранной аминокислотной последовательности.

Идентичность последовательности по существу означает, что последовательность содержит изменения, но сохраняет эффекты, раскрытые в настоящем изобретении. Указанная последовательность идентична вариательной области тяжелой цепи, раскрытой в одном из воплощений, приблизительно на 90%, 95% или 99%. Указанная последовательность идентична вариательной области легкой цепи, раскрытой в других воплощениях, приблизительно на 90%, 95% или 99%. Например, в случае варианта, демонстрирующего приблизительно 90%, 95% или 99% идентичность последовательности антитела или антигенсвязывающего фрагмента, раскрытых в настоящем изобретении, любое изменение последовательности происходит в каркасной области вариательной области, но не в CDR.

[Таблица 1] Последовательности CDR вариательной области тяжелой цепи в клоне антитела по настоящему изобретению

Идентификатор клона	CDR-H1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H3	SEQ ID NO:
996-1	GFTFSSYDMS	1	GIYHDGSSTYYADSVKG	10	VSGTLSEPYAFFFNAMDV	50
996-2	GFTFSSYDMS	1	GIYHDGSSTYYADSVKG	10	VSGTLSEPYAFFFNAMDV	50
1226-1	GFTFSNYDMS	2	SISPDGGSKYYADSVKG	11	DGGTHWLSLFDY	51
1226-2	GFTFSNYDMS	2	SISPDGGSKYYADSVKG	11	DGGTHWLSLFDY	51
1564-1	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
1564-2	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
1564-3P	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
1564-DM	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNTYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFYD	52
1564-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNTYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFYD	52
48G5-1	GFTFSDYDMS	3	SIYPNGSSKYYADSVKG	14	AGINCTTLRCSSYDAMDV	53
48G5-2	GFTFSDYDMS	3	SIYPNGSSKYYADSVKG	14	AGINCTTLRCSSYDAMDV	53
49G11-1	GFTFSSYDMS	1	GISYSGGSTYYADSVKG	15	VGLACTPHTCSSYDAMDV	54
49G11-2	GFTFSSYDMS	1	GISYSGGSTYYADSVKG	15	VGLACTPHTCSSYDAMDV	54

54H4-1	GFTFSDYDM S	3	AISSDGSSAYYADSVKG	16	ATIYTSDAPWSSYDAMDV	55
54H4-2	GFTFSDYDM S	3	AISSDGSSAYYADSVKG	16	ATIYTSDAPWSSYDAMDV	55
60A11-1	GFTFSNYDM S	2	VISHSSSGTTYADSVKG	17	VGVACGETDCSSYDAMDV	56
60A11-2	GFTFSNYDM S	2	VISHSSSGTTYADSVKG	17	VGVACGETDCSSYDAMDV	56
60H6-1	GFTFSDYDM S	3	MIYSGSSSKYYADSVKG	18	ASIACTLQACSYDNAMDV	57
60H6-2	GFTFSDYDM S	3	MIYSGSSSKYYADSVKG	18	ASIACTLQACSYDNAMDV	57
60H6-3P	GFTFSDYDM S	3	MIYSGSSSKYYADSVKG	18	ASIACTLQACSYDNAMDV	57
A1_ompseq	GFTFSSYDMS	1	AIYHDGGNTYYADSVK G	19	AASPCNVHDCSYDYAMD V	58
A3_ompseq	GFTFSDYDM S	3	GISYNGGSKYYADSVKG	20	VGIMCSETGCSYDNAMDV	59
A6_ompseq	GFTFSDYYM S	4	GISSDGGSIYYADSVKG	21	YASPTWLHILYYSDAMDV	60
A8_ompseq	GFTFSNYDM S	2	MIYSGSSSKYYADSVKG	18	ALIPCTPEGCYSDAMDV	61
A10_ompseq	GFTFSGYAM S	5	AISSDGGSTYYADSVKG	22	DPWFSRWTAFDY	62
A12_ompseq	GFTFSDYDM S	3	GIYPDGGNIYYADSVKG	23	GIGQCELRECSSDDGMDV	63
B5_ompseq	GFTFSDYDM S	3	AIYYDSGSIYYADSVKG	24	AVSECNPLNCSYSDAMDV	64
B9_ompseq	GFTFSDYDM S	3	MIYSGSSSKYYADSVKG	18	VILGCSKHSCPSSDAMDV	65
B11_ompseq	GFTFSDYDM S	3	AISYDNGNKYYADSVK G	25	AGVACTEHEMCSSYDAMD V	66
C2_ompseq	GFTFSSYDMS	1	LIYPGGGNIYYADSVKG	26	GRVPCHPGGCSYAYGMDV	67
C6_ompseq	GFTFSNYAM S	6	WISSGGGSTYYADSVKG	27	LGSFLPNATASYAYGMDV	68
C7_ompseq	GFTFSNYDM S	2	SISYDSGSKYYADSVKG	28	AGILCTPTHCSSYDAMDV	69
C11_ompseq	GFTFSDYAM S	7	SIYPDDGNTYYADSVKG	29	DGWTPDGTHFDY	70

D4_ompseq	GFTFSDYDM S	3	WISHSSSGTYYADSVKG	30	VGLSCAETACSSYDAMDV	71
E6_ompseq	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	VGLDCDTTKCSSYDAMDV	72
E10_ompseq	GFTFSNYDM S	2	VISHSSSGTYYADSVKG	17	VGVACGETDCSSYDAMDV	56
E12_ompseq	GFTFSDYDM S	3	WISHSSSGTYYADSVKG	30	VGLSCAETACSSYDAMDV	71
F6_ompseq	GFTFSDYDM S	3	MIYSGSSSKYYADSVKG	18	AVRPCTDLHCSSDDAMDV	73
F11_ompseq	GFTFSDYDM S	3	AISYDSGSKYYADSVKG	31	VGRMCNITHCSSYDAMDV	74
F12_ompseq	GFTFSDYDM S	3	SIYYGSGNIYYADSVKG	32	DLTAPDGSSFDY	75
G9_ompseq	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGSSIYYADSVK G	33	VGLECTVEHCYSYDGMDV	76
C04-1	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
C04-2	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
C04-3P	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
C04-DM	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNTYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFYD	52
C04-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNTYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFYD	52
F06-1	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
F06-2	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
F06-3P	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
F06-DM	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNTYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFYD	52
F06-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNTYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFYD	52
B01	GFTFSSYDMS	1	AISWDKAQPYYADSVK G	34	GVLTTLMNWFYD	52
A07(AR)	GFTFSSYDMS	1	AISWDQGNSYYADSVK G	35	GVLTTLMNWFYD	52
E09	GFTFSSYDMS	1	AISWGQGKTYADSVK G	36	GVLTTLMNWFYD	52
D03	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGQTYADSVKG	37	GVLTTLMNWFYD	52
A02	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
B09	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
B10	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
E06	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
H04	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
A06	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52
A07(AM)	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYD	52

B02	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFYDY	52
VH02-1	GFTFSSYAMS	8	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLANWFYDY	77
VH02-2	GFTFSSYAMS	8	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLANWFYDY	77
VH02-3P	GFTFSSYAMS	8	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLANWFYDY	77
VH02-DM	GFTFSSYAMS	8	AISGSQGNNTYYADSVKG	39	GVLTTLANWFYDY	77
VH02-DMP	GFTFSSYAMS	8	AISGSQGNNTYYADSVKG	39	GVLTTLANWFYDY	77
VH05-1	GFTFSSYDMS	1	AISGDNGSTYYADSVKG	40	GVLTTLMNWFDS	78
VH05-2	GFTFSSYDMS	1	AISGDNGSTYYADSVKG	40	GVLTTLMNWFDS	78
VH05-3P	GFTFSSYDMS	1	AISGDNGSTYYADSVKG	40	GVLTTLMNWFDS	78
VH05-DM	GFTFSSYDMS	1	AISGDQGNNTYYADSVKG	41	GVLTTLMNWFDS	78
VH05-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISGDQGNNTYYADSVKG	41	GVLTTLMNWFDS	78
VH06-1	GFTFSSYDMS	1	AISYSNGNTYYADSVKG	42	GVLTTLANWFYDY	77
VH06-2	GFTFSSYDMS	1	AISYSNGNTYYADSVKG	42	GVLTTLANWFYDY	77
VH06-3P	GFTFSSYDMS	1	AISYSNGNTYYADSVKG	42	GVLTTLANWFYDY	77
VH06-DM	GFTFSSYDMS	1	AISYSQGNNTYYADSVKG	43	GVLTTLANWFYDY	77
VH06-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISYSQGNNTYYADSVKG	43	GVLTTLANWFYDY	77
VH07-1	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFYDY	52
VH07-2	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFYDY	52
VH07-3	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFYDY	52
VH07-DM	GFTFSSYAMS	8	AISYDQGNNTYYADSVKG	45	GVLTTLMNWFYDY	52
VH07-DMP	GFTFSSYAMS	8	AISYDQGNNTYYADSVKG	45	GVLTTLMNWFYDY	52
VH09-1	GFTFSSYDMS	1	AISGDNGNTYYADSVKG	46	GVLTTLMNWFYDY	52
VH09-2	GFTFSSYDMS	1	AISGDNGNTYYADSVKG	46	GVLTTLMNWFYDY	52
VH09-3P	GFTFSSYDMS	1	AISGDNGNTYYADSVKG	46	GVLTTLMNWFYDY	52
VH09-DM	GFTFSSYDMS	1	AISGDQGNNTYYADSVKG	47	GVLTTLMNWFYDY	52
VH09-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISGDQGNNTYYADSVKG	47	GVLTTLMNWFYDY	52
VH16-1	GFTFSSYDMS	1	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLMNWFYDY	52
VH16-2	GFTFSSYDMS	1	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLMNWFYDY	52
VH16-3P	GFTFSSYDMS	1	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLMNWFYDY	52
VH16-DM	GFTFSSYDMS	1	AISGSQGNNTYYADSVKG	39	GVLTTLMNWFYDY	52
VH16-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISGSQGNNTYYADSVKG	39	GVLTTLMNWFYDY	52
VH27-1	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFDS	78
VH27-2	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFDS	78
VH27-3P	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFDS	78
VH27-DM	GFTFSSYAMS	8	AISYDQGNNTYYADSVKG	45	GVLTTLMNWFDS	78
VH27-DMP	GFTFSSYAMS	8	AISYDQGNNTYYADSVKG	45	GVLTTLMNWFDS	78
VH32-1	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLANWFYDY	77
VH32-2	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLANWFYDY	77

VH32-3	GFTFSSYAMS	8	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLANWFDY	77
VH32-DM	GFTFSSYAMS	8	AISYDQGNNTYYADSVKG	13	GVLTTLANWFDY	77
VH32-DMP	GFTFSSYAMS	8	AISYDQGNNTYYADSVKG	13	GVLTTLANWFDY	77
VH35-1	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFDY	78
VH35-2	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFDY	78
VH35-3	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGSTYYADSVKG	44	GVLTTLMNWFDY	78
VH35-DM	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNNTYYADSVKG	45	GVLTTLMNWFDY	78
VH35-DMP	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNNTYYADSVKG	45	GVLTTLMNWFDY	78
VH48	GFTFSSYAMS	8	AISGSNGNTYYADSVKG	38	GVLTTLANWFDY	79
VH55	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLANWFDY	77
VH81	GFTFSSYDMS	1	AISGSNGSTYYADSVKG	48	GVLTTLMNWFDY	52
C12	GFTFICPILS	9	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMCLRHL	80
1564-VL(N51D)	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFDY	52
1564-VL(N95aD)	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFDY	52
1564-VL(N95aH)	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFDY	52
1564-VL(N95aK)	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFDY	52
1564-VL(N95aR)	GFTFSSYDMS	1	AISYDNGNTYYADSVKG	12	GVLTTLMNWFDY	52
1564-VH(N54D)	GFTFSSYDMS	1	AISYDDGNTYYADSVKG	49	GVLTTLMNWFDY	52
1564-VH(N54Q)	GFTFSSYDMS	1	AISYDQGNNTYYADSVKG	13	GVLTTLMNWFDY	52

[Таблица 2] Последовательности CDR варибельной области легкой цепи в клоне антитела по настоящему изобретению

Идентификатор клона	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
996-1	TGSSSNIGSNAVN	96	SNSHRPS	114	ATWDYSLSGYV	133
996-2	TGSSSNIGSNAVN	96	SNSHRPS	114	ATWDYSLSGYV	133
1226-1	TGSSSNIGNNTVS	97	YDNHRPS	115	GSWDASLNGYV	134
1226-2	TGSSSNIGNNTVS	97	YDNHRPS	115	GSWDASLNGYV	134
1564-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
1564-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
1564-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
1564-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
1564-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
48G5-1	SGSSSNIGNNDVS	99	DNNHRPS	118	AAWDDSLNAYV	137

48G5-2	SGSSSNIGNNDVS	99	DNNHRPS	118	AAWDDSLNAYV	137
49G11-1	TGSSSNIGSNTVY	100	SDSNRPS	119	GTWDDSLNGYV	138
49G11-2	TGSSSNIGSNTVY	100	SDSNRPS	119	GTWDDSLNGYV	138
54H4-1	SGSSSNIGSNTVT	101	ADSKRPS	120	GTWDDSLNAYV	139
54H4-2	SGSSSNIGSNTVT	101	ADSKRPS	120	GTWDDSLNAYV	139
60A11-1	SGSSSNIGSNAVT	102	DDNHRPS	121	GAWDDSLNGYV	135
60A11-2	SGSSSNIGSNAVT	102	DDNHRPS	121	GAWDDSLNGYV	135
60H6-1	TGSSSNIGNNDVS	103	ANSHRPS	122	GSWDDSLNGYV	140
60H6-2	TGSSSNIGNNDVS	103	ANSHRPS	122	GSWDDSLNGYV	140
60H6-3	TGSSSNIGNNDVS	103	ANSHRPS	122	GSWDDSLNGYV	140
A1_ompseq	SGSSSNIGNNAVT	104	DDSQRPS	123	GSWDDSLNGYV	140
A3_ompseq	SGSSSNIGNNDVD	105	YDSQRPS	124	GTWDDSLNAYV	139
A6_ompseq	SGSSSNIGNNAVT	104	DDSHRPS	125	GSWDDSLNGYV	141
A8_ompseq	TGSSSNIGNNDVS	103	DDSKRPS	126	GAWDDSLNGYV	135
A10_ompseq	SGSSSNIGNNAVN	106	SNSKRPS	127	GTWDYSLSGYV	142
A12_ompseq	TGSSSNIGNNDVN	107	SNSHRPS	114	GTWDDSLNGYV	138
B5_ompseq	SGSSSNIGNNDVS	99	DDNQRP	128	ATWDASLNGYV	143
B9_ompseq	SGSSSNIGNNNVT	108	DDSQRPS	123	GSWDDSLNGYV	140
B11_ompseq	SGSSSNIGNNDVS	99	DDNHRPS	121	GAWDYSLSGYV	144
C2_ompseq	SGSSFNIGSNDVS	109	DNSKRPS	129	GTWDDSLNGYV	138
C6_ompseq	SGSSSNIGSNDVS	110	DNSQRPS	648	GSWDASLNAYV	145
C7_ompseq	SGSSSNIGNNDVN	111	SNSHRPS	114	GTWDDSLNGYV	138
C11_ompseq	SGSSSNIGNNDVS	99	SNSHRPS	114	GSWDASLNGYV	134
D4_ompseq	SGSSSNIGSNDVS	110	DDSNRPS	130	GSWDDSLNGYV	140
E6_ompseq	SGSSSNIGNNDVN	111	SNSHRPS	114	GAWDYSLSAYV	146
E10_ompseq	SGSSSNIGSNAVT	102	DDNHRPS	121	GAWDDSLNGYV	135
E12_ompseq	SGSSSNIGSNDVS	110	DDSNRPS	130	GSWDDSLNGYV	140
F6_ompseq	SGSSSNIGNNDVS	99	DNNHRPS	118	AAWDDSLNAYV	137
F11_ompseq	TGSSSNIGSNYVS	112	DDSHRPS	125	GAWDDSLNGYV	135
F12_ompseq	TGSSSNIGNNDVS	103	SDSQRPS	131	GAWDASLNGYV	147
G9_ompseq	TGSSSNIGSNTVN	113	DNSQRPS	648	ASWDDSLNAYV	148
C04-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWEQWLNGYV	149
C04-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWEQWLNGYV	149
C04-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWEQWLNGYV	149
C04-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWEQWLHGYV	150
C04-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWEQWLHGYV	150
F06-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GTWAGSLNGYV	151
F06-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GTWAGSLNGYV	151

F06-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GTWAGSLNGYV	151
F06-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GTWAGSLHGYV	152
F06-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GTWAGSLHGYV	152
B01	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
A07(AR)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
E09	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
D03	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
A02	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDTTLNGYV	153
B09	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWEESLNGYV	154
B10	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GSWDVSLNGYV	155
E06	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDHSLNGYV	156
H04	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDQSLNGYV	157
A06	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GASWDEWLNGYV	158
A07(AM)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDETLNGYV	159
B02	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GTWDDSLNGYV	138
VH02-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH02-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH02-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH02-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH02-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH05-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH05-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH05-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH05-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH05-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH06-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH06-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH06-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH06-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH06-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH07-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH07-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH07-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH07-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH07-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH09-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH09-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH09-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135

VH09-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH09-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH16-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH16-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH16-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH16-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH16-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH27-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH27-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH27-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH27-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH27-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH32-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH32-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH32-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH32-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH32-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH35-1	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH35-2	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH35-3	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH35-DM	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH35-DMP	TGSSSNIGSNDVS	98	AQSNRPS	117	GAWDDSLHGYV	136
VH48	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH55	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
VH81	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
C12	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
1564-VL(N51D)	TGSSSNIGSNDVS	98	ADSNRPS	132	GAWDDSLNGYV	135
1564-VL(N95aD)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLDGYV	160
1564-VL(N95aH)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLHGYV	136
1564-VL(N95aK)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLKGYV	161
1564-VL(N95aR)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLKGYV	161
1564-VH(N54D)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135
1564-VH(N54Q)	TGSSSNIGSNDVS	98	ANSNRPS	116	GAWDDSLNGYV	135

Каркасная область тяжелой цепи, выбранная из группы, состоящей из H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4, по настоящему изобретению может быть выбрана из аминокислотных последовательностей Таблицы 3. Каркасная область легкой цепи, выбранная из группы, состоящей из L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4, по настоящему изобретению может быть выбрана из аминокислотных последовательностей Таблицы 4.

Конкретно, вариабельная область тяжелой цепи антитела против IGF1R по настоящему изобретению содержит H-CDR1, H-CDR2 и H-CDR3, описанные в Таблице 1, или дополнительно H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4, показанные в Таблице 3. Вариабельная область легкой цепи антитела против IGF1R по настоящему изобретению содержит L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3, показанные в Таблице 3, или дополнительно L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4, показанные в Таблице 4. В одном воплощении настоящего изобретения антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 каждого клона, выбранные из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, показанных в Таблице 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 каждого клона, выбранные из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, показанных в Таблице 2.

В одном воплощении настоящего изобретения аминокислотная модификация, например, устранение дезамидирования аминокислоты в Fc-области антитела против IGF1R, может улучшать ФК (фармакокинетику) антитела благодаря снижению его клиренса в крови без изменения способности к связыванию с ECD антигена IGF1R и приводить к увеличению периода полувыведения. В одном примере аминокислотное положение в антителе против IGF1R, в котором устраняют дезамидирование, может представлять собой N51D в L-CDR2 легкой цепи, или N95aK, N95aH, N95aR или N95aD в L-CDR3 легкой цепи, или N54D или N54Q в H-CDR2 тяжелой цепи клона 1564.

[Таблица 3] Последовательности каркасных областей вариабельной области тяжелой цепи в клоне антитела по настоящему изобретению

Идентифи- катор клона	H-FR1	SEQ ID NO:	H-FR2	SEQ ID NO:	H-FR3	SEQ ID NO:	H-FR4	SEQ ID NO:
	996-1	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	87	WGQGTL VTVSS
996-2	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	87	WGQGTL VTVSS	92

1226-1	EVQLES GGGLV QP GGLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1226-2	EVQLES GGGLV QP GGLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564-1	EVQLES GGGLV QP GGLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564-2	EVQLES GGGLV QP GGLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564-3P	EVQLES GGGLV QP GGLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564-DM	EVQLES GGGLV QP GGLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564-DMP	EVQLES GGGLV QP GGLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
48G5-1	EVQLES GGGLV QP GGLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
48G5-2	EVQLES GGGLV QP GGLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
49G11-1	EVQLES GGGLV QP GGLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
49G11-2	EVQLES GGGLV QP GGLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
54H4-1	EVQLES GGGLV QP GGLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
54H4-2	EVQLES GGGLV QP GGLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL ATVSS	93

60A11-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
60A11-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
60H6-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
60H6-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
60H6-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
A1_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
A3_ompseq	EVQLLESGGGLV QTGGSLRLSCAA S	82	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
A6_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
A8_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAR	89	WGQGTL VTVSS	92
A10_ompseq	EVQLLESGGGLA QPGGSLRLSCAA S	83	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAR	89	WGQGTL VTVSS	92
A12_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAR	89	WGQGTL VTVSS	92
B5_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
B9_ompseq	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

B11_ompseq	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C2_ompseq	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAR	89	WGQGTL VTVSS	92
C6_ompseq	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C7_ompseq	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C11_ompseq	EVQLLES GGGLV QTGGSLRLSCAA S	82	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
D4_ompseq	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDAA VYYCAK	90	WGQGTL VTVSS	92
E6_ompseq	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAR	89	WGQGTL VTVSS	92
E10_ompseq	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN PKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	91	WGQGTL VTVSS	92
E12_ompseq	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDAA VYYCAK	90	WGQGTL VTVSS	92
F6_ompseq	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
F11_ompseq	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
F12_ompseq	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTQ VTVSS	94
G9_ompseq	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

C04-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C04-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK cLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C04-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK cLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C04-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C04-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
F06-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
F06-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
F06-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
F06-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
F06-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
B01	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
A07(AR)	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
E09	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

D03	EVQLES GGGLV QPGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
A02	EVQLES GGGLV QPGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
B09	EVQLES GGGLV QPGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
B10	EVQLES GGGLV QPGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
E06	EVQLES GGGLV QPGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
H04	EVQLES GGGLV QPGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
A06	EVQLES GGGLV QPGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
A07(AM)	EVQLES GGGLV QPGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
B02	EVQLES GGGLV QPGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH02-1	EVQLES GGGLV QPGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH02-2	EVQLES GGGLV QPGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH02-3P	EVQLES GGGLV QPGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH02-DM	EVQLES GGGLV QPGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

VH02-DMP	EVQLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH05-1	EVQLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH05-2	EVQLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH05-3P	EVQLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH05-DM	EVQLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH05-DMP	EVQLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH06-1	EVQLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH06-2	EVQLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH06-3P	EVQLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH06-DM	EVQLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH06-DMP	EVQLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH07-1	EVQLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH07-2	EVQLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

VH07-3	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH07-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH07-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH09-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH09-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH09-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH09-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH09-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH16-1	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH16-2	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH16-3P	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH16-DM	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH16-DMP	EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

VH27-1	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH27-2	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH27-3P	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH27-DM	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH27-DMP	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH32-1	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH32-2	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH32-3	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH32-DM	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH32-DMP	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH35-1	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH35-2	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH35-3	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

VH35-DM	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH35-DMP	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK CLEWVS	86	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH48	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH55	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
VH81	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
C12	EVQLLES GGGLV QPGGSLRRSCAA S	84	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGSL VTVSS	95
1564- VL(N51D)	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564- VL(N95aD)	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564- VL(N95aH)	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564- VL(N95aK)	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564- VL(N95aR)	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564- VH(N54D)	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92
1564- VH(N54Q)	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAA S	81	WVRQAPGK GLEWVS	85	RFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAV YYCAK	88	WGQGTL VTVSS	92

[Таблица 4] Последовательности каркасных областей варибельной области легкой цепи в клоне антитела по настоящему изобретению

Идентификатор клона	L-FR1	SEQ ID NO:	L-FR2	SEQ ID NO:	L-FR3	SEQ ID NO:	L-FR4	SEQ ID NO:
996-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
996-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
1226-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
1226-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
1564-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
1564-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
1564-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
1564-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
1564-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
48G5-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
48G5-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
49G11-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
49G11-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
54H4-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
54H4-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
60A11-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
60A11-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRV TISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

60H6-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
60H6-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
60H6-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
A1_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRATISC	163	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
A3_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
A6_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
A8_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
A10_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
A12_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDGADYYC	168	FGGGT KLTVL	169
B5_ompseq	QSVLTQPPSAS GPPGQRTVISC	164	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
B9_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
B11_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
C2_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
C6_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
C7_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDGADYYC	168	FGGGT KLTVL	169
C11_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
D4_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
E6_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
E10_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTFL	171

E12_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
F6_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
F11_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
F12_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
G9_ompseq	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
C04-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
C04-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
C04-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
C04-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
C04-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
F06-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
F06-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
F06-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
F06-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
F06-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
B01	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
A07(AR)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
E09	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
D03	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169

A02	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
B09	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
B10	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
E06	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
H04	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
A06	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
A07(AM)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
B02	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
VH02-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH02-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH02-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH02-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH02-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH05-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH05-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH05-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH05-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH05-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH06-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169

VH06-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH06-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH06-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH06-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH07-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH07-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH07-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH07-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH07-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH09-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH09-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH09-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH09-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH09-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH16-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH16-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH16-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH16-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH16-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170

VH27-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH27-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH27-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH27-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH27-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH32-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH32-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH32-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH32-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH32-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH35-1	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH35-2	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH35-3	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH35-DM	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGCGT KLTVL	170
VH35-DMP	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGCGT KLTVL	170
VH48	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH55	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
VH81	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
C12	QSVLTQPPSAS GTPGQRTISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169

1564-VL(N51D)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
1564-VL(N95aD)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
1564-VL(N95aH)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
1564-VL(N95aK)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
1564-VL(N95aR)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVSDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	167	FGGGT KLTVL	169
1564-VH(N54D)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169
1564-VH(N54Q)	QSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC	162	WYQQLPG TAPKLLIY	165	GVPDRFSGSKSGTSASL AISGLRSEDEADYYC	166	FGGGT KLTVL	169

Антитело против IGF1R по настоящему изобретению может представлять собой антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, и различные вариабельные области тяжелой и легкой цепи, раскрытые в настоящем описании, показаны в Таблицах 5 и 6, CDR1-CDR3 и каркасные области 1-4 каждого клона описаны как SEQ ID NO.

Вариабельные области тяжелой цепи и вариабельные области легкой цепи, описанные в Таблице 5 и Таблице 6, можно свободно комбинировать для получения различных типов антител. Примеры комбинаций вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи показаны в Таблице 5 и Таблице 6.

[Таблица 5] Вариабельная область тяжелой цепи антитела по настоящему изобретению

SEQ ID NO	Тяжелая цепь (VH)	CDR- H1	CDR- H2	CDR- H3	H- FR1	H- FR2	H- FR3	H- FR4
172	996-1	1	10	50	81	85	87	92
173	996-2	1	10	50	81	86	87	92
174	1226-1	2	11	51	81	85	88	92
175	1226-2	2	11	51	81	86	88	92
176	1564-1	1	12	52	81	85	88	92
177	1564-2	1	12	52	81	86	88	92
178	1564-3	1	12	52	81	86	88	92
179	1564-DM	1	13	52	81	86	88	92

180	1564-DMP	1	13	52	81	86	88	92
181	48G5-1	3	14	53	81	85	88	92
182	48G5-2	3	14	53	81	86	88	92
183	49G11-1	1	15	54	81	85	88	92
184	49G11-2	1	15	54	81	86	88	92
185	54H4-1	3	16	55	81	85	88	92
186	54H4-2	3	16	55	81	86	88	93
187	60A11-1	2	17	56	81	85	88	92
188	60A11-2	2	17	56	81	86	88	92
189	60H6-1	3	18	57	81	85	88	92
190	60H6-2	3	18	57	81	86	88	92
191	60H6-3	3	18	57	81	86	88	92
192	A1_OMPSEQ	1	19	58	81	85	88	92
193	A3_OMPSEQ	3	20	59	82	85	88	92
194	A6_OMPSEQ	4	21	60	81	85	88	92
195	A8_OMPSEQ	2	18	61	81	85	89	92
196	A10_OMPSEQ	5	22	62	83	85	89	92
197	A12_OMPSEQ	3	23	63	81	85	89	92
198	B5_OMPSEQ	3	24	64	81	85	88	92
199	B9_OMPSEQ	3	18	65	81	85	88	92
200	B11_OMPSEQ	3	25	66	81	85	88	92
201	C2_OMPSEQ	1	26	67	81	85	89	92
202	C6_OMPSEQ	6	27	68	81	85	88	92
203	C7_OMPSEQ	2	28	69	81	85	88	92
204	C11_OMPSEQ	7	29	70	82	85	88	92
205	D4_OMPSEQ	3	30	71	81	85	90	92
206	E06_OMPSEQ	1	12	72	81	85	89	92
207	E10_OMPSEQ	2	17	56	81	85	91	92
208	E12_OMPSEQ	3	30	71	81	85	90	92
209	F06_OMPSEQ	3	18	73	81	85	88	92
210	F11_OMPSEQ	3	31	74	81	85	88	92
211	F12_OMPSEQ	3	32	75	81	85	88	94

212	G9_OMPSEQ	1	33	76	81	85	88	92
213	C04-1	1	12	52	81	85	88	92
214	C04-2	1	12	52	81	86	88	92
215	C04-3	1	12	52	81	86	88	92
216	C04-DM	1	13	52	81	86	88	92
217	C04-DMP	1	13	52	81	86	88	92
218	F06-1	1	12	52	81	85	88	92
219	F06-2	1	12	52	81	86	88	92
220	F06-3	1	12	52	81	86	88	92
221	F06-DM	1	13	52	81	86	88	92
222	F06-DMP	1	13	52	81	86	88	92
223	B01	1	34	52	81	85	88	92
224	A07(AR)	1	35	52	81	85	88	92
225	E09	1	36	52	81	85	88	92
226	D03	1	37	52	81	85	88	92
227	A02	1	12	52	81	85	88	92
228	B09	1	12	52	81	85	88	92
229	B10	1	12	52	81	85	88	92
230	E06	1	12	52	81	85	88	92
231	H04	1	12	52	81	85	88	92
232	A06	1	12	52	81	85	88	92
233	A07(AM)	1	12	52	81	85	88	92
234	B02	1	12	52	81	85	88	92
235	VH2-1	8	38	77	81	85	88	92
236	VH2-2	8	38	77	81	86	88	92
237	VH2-3	8	38	77	81	86	88	92
238	VH2-DM	8	39	77	81	86	88	92
239	VH2-DMP	8	39	77	81	86	88	92
240	VH5-1	1	40	78	81	85	88	92
241	VH5-2	1	40	78	81	86	88	92
242	VH5-3	1	40	78	81	86	88	92
243	VH5-DM	1	41	78	81	86	88	92

244	VH5-DMP	1	41	78	81	86	88	92
245	VH6-1	1	42	77	81	85	88	92
246	VH6-2	1	42	77	81	86	88	92
247	VH6-3	1	42	77	81	86	88	92
248	VH6-DM	1	43	77	81	86	88	92
249	VH6-DMP	1	43	77	81	86	88	92
250	VH7-1	8	44	52	81	85	88	92
251	VH7-2	8	44	52	81	86	88	92
252	VH7-3	8	44	52	81	86	88	92
253	VH7-DM	8	45	52	81	86	88	92
254	VH7-DMP	8	45	52	81	86	88	92
255	VH9-1	1	46	52	81	85	88	92
256	VH9-2	1	46	52	81	86	88	92
257	VH9-3	1	46	52	81	86	88	92
258	VH9-DM	1	47	52	81	86	88	92
259	VH9-DMP	1	47	52	81	86	88	92
260	VH16-1	1	38	52	81	85	88	92
261	VH16-2	1	38	52	81	86	88	92
262	VH16-3	1	38	52	81	86	88	92
263	VH16-DM	1	39	52	81	86	88	92
264	VH16-DMP	1	39	52	81	86	88	92
265	VH27-1	8	44	78	81	85	88	92
266	VH27-2	8	44	78	81	86	88	92
267	VH27-3	8	44	78	81	86	88	92
268	VH27-DM	8	45	78	81	86	88	92
269	VH27-DMP	8	45	78	81	86	88	92
270	VH32-1	8	12	77	81	85	88	92
271	VH32-2	8	12	77	81	86	88	92
272	VH32-3	8	12	77	81	86	88	92
273	VH32-DM	8	13	77	81	86	88	92
274	VH32-DM	8	13	77	81	86	88	92
275	VH35-1	1	44	78	81	85	88	92

276	VH35-2	1	44	78	81	86	88	92
277	VH35-3	1	44	78	81	86	88	92
278	VH35-DM	1	45	78	81	86	88	92
279	VH35-DMP	1	45	78	81	86	88	92
280	VH48	8	38	79	81	85	88	92
281	VH55	1	12	77	81	85	88	92
282	VH81	1	48	52	81	85	88	92
283	C12	9	12	80	84	85	88	95
284	1564-VL(N51D)	1	12	52	81	85	88	92
285	1564-VL(N95aD)	1	12	52	81	85	88	92
286	1564-VL(N95aH)	1	12	52	81	85	88	92
287	1564-VL(N95aK)	1	12	52	81	85	88	92
288	1564-VL(N95aR)	1	12	52	81	85	88	92
289	1564-VH(N54D)	1	49	52	81	85	88	92
290	1564-VH(N54Q)	1	13	52	81	85	88	92

[Таблица 6] Варибельная область легкой цепи антитела по настоящему изобретению

SEQ ID NO	Легкая цепь (VH)	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	L-FR1	L-FR2	L-FR3	L-FR4
291	996-1	96	114	133	162	165	166	169
292	996-2	96	114	133	162	165	166	170
293	1226-1	97	115	134	162	165	166	169
294	1226-2	97	115	134	162	165	166	170
295	1564-1	98	116	135	162	165	166	169
296	1564-2	98	116	135	162	165	167	170
297	1564-3	98	116	135	162	165	166	170
298	1564-DM	98	117	136	162	165	167	170
299	1564-DMP	98	117	136	162	165	166	170
300	48G5-1	99	118	137	162	165	166	169
301	48G5-2	99	118	137	162	165	166	170
302	49G11-1	100	119	138	162	165	166	169
303	49G11-2	100	119	138	162	165	166	170

304	54H4-1	101	120	139	162	165	166	169
305	54H4-2	101	120	139	162	165	166	170
306	60A11-1	102	121	135	162	165	166	169
307	60A11-2	102	121	135	162	165	166	170
308	60H6-1	103	122	140	162	165	166	169
309	60H6-2	103	122	140	162	165	167	170
310	60H6-3	103	122	140	162	165	166	170
311	A1_OMPSEQ	104	123	140	163	165	166	169
312	A3_OMPSEQ	105	124	139	162	165	166	169
313	A6_OMPSEQ	104	125	141	162	165	166	169
314	A8_OMPSEQ	103	126	135	162	165	166	169
315	A10_OMPSEQ	106	127	142	162	165	166	169
316	A12_OMPSEQ	107	114	138	162	165	168	169
317	B5_OMPSEQ	99	128	143	164	165	166	169
318	B9_OMPSEQ	108	123	140	162	165	166	169
319	B11_OMPSEQ	99	121	144	162	165	166	169
320	C2_OMPSEQ	109	129	138	162	165	166	169
321	C6_OMPSEQ	110	648	145	162	165	166	169
322	C7_OMPSEQ	111	114	138	162	165	166	169
323	C11_OMPSEQ	99	114	134	162	165	166	169
324	D4_OMPSEQ	110	130	140	162	165	166	169
325	E06_OMPSEQ	111	114	146	162	165	166	169
326	E10_OMPSEQ	102	121	135	162	165	166	171
327	E12_OMPSEQ	110	130	140	162	165	166	169
328	F06_OMPSEQ	99	118	137	162	165	166	169
329	F11_OMPSEQ	112	125	135	162	165	167	169
330	F12_OMPSEQ	103	131	147	162	165	166	169
331	G9_OMPSEQ	113	648	148	162	165	166	169
332	C04-1	98	116	149	162	165	166	169
333	C04-2	98	116	149	162	165	167	170
334	C04-3	98	116	149	162	165	166	170

335	C04-DM	98	117	150	162	165	167	170
336	C04-DMP	98	117	150	162	165	166	170
337	F06-1	98	116	151	162	165	166	169
338	F06-2	98	116	151	162	165	167	170
339	F06-3	98	116	151	162	165	166	170
340	F06-DM	98	117	152	162	165	167	170
341	F06-DMP	98	117	152	162	165	166	170
342	B01	98	116	135	162	165	167	169
343	A07(AR)	98	116	135	162	165	167	169
344	E09	98	116	135	162	165	167	169
345	D03	98	116	135	162	165	167	169
346	A02	98	116	153	162	165	167	169
347	B09	98	116	154	162	165	167	169
348	B10	98	116	155	162	165	167	169
349	E06	98	116	156	162	165	167	169
350	H04	98	116	157	162	165	167	169
351	A06	98	116	158	162	165	167	169
352	A07(AM)	98	116	159	162	165	167	169
353	B02	98	116	138	162	165	167	169
354	VH2-1	98	116	135	162	165	166	169
355	VH2-2	98	116	135	162	165	167	170
356	VH2-3	98	116	135	162	165	166	170
357	VH2-DM	98	117	136	162	165	167	170
358	VH2-DMP	98	117	136	162	165	166	170
359	VH5-1	98	116	135	162	165	166	169
360	VH5-2	98	116	135	162	165	167	170
361	VH5-3	98	116	135	162	165	166	170
362	VH5-DM	98	117	136	162	165	167	170
363	VH5-DMP	98	117	136	162	165	166	170
364	VH6-1	98	116	135	162	165	166	169
365	VH6-2	98	116	135	162	165	167	170

366	VH6-3	98	116	135	162	165	166	170
367	VH6-DM	98	117	136	162	165	167	170
368	VH6-DMP	98	117	136	162	165	166	170
369	VH7-1	98	116	135	162	165	166	169
370	VH7-2	98	116	135	162	165	167	170
371	VH7-3	98	116	135	162	165	166	170
372	VH7-DM	98	117	136	162	165	167	170
373	VH7-DMP	98	117	136	162	165	166	170
374	VH9-1	98	116	135	162	165	166	169
375	VH9-2	98	116	135	162	165	167	170
376	VH9-3	98	116	135	162	165	166	170
377	VH9-DM	98	117	136	162	165	167	170
378	VH9-DMP	98	117	136	162	165	166	170
379	VH16-1	98	116	135	162	165	166	169
380	VH16-2	98	116	135	162	165	167	170
381	VH16-3	98	116	135	162	165	166	170
382	VH16-DM	98	117	136	162	165	167	170
383	VH16-DMP	98	117	136	162	165	166	170
384	VH27-1	98	116	135	162	165	166	169
385	VH27-2	98	116	135	162	165	167	170
386	VH27-3	98	116	135	162	165	166	170
387	VH27-DM	98	117	136	162	165	167	170
388	VH27-DMP	98	117	136	162	165	166	170
389	VH32-1	98	116	135	162	165	166	169
390	VH32-2	98	116	135	162	165	167	170
391	VH32-3	98	116	135	162	165	166	170
392	VH32-DM	98	117	136	162	165	167	170
393	VH32-DM	98	117	136	162	165	166	170
394	VH35-1	98	116	135	162	165	166	169
395	VH35-2	98	116	135	162	165	167	170
396	VH35-3	98	116	135	162	165	166	170

397	VH35-DM	98	117	136	162	165	167	170
398	VH35-DMP	98	117	136	162	165	166	170
399	VH48	98	116	135	162	165	166	169
400	VH55	98	116	135	162	165	166	169
401	VH81	98	116	135	162	165	166	169
402	C12	98	116	135	162	165	166	169
403	1564-VL(N51D)	98	132	135	162	165	167	169
404	1564-VL(N95aD)	98	116	160	162	165	167	169
405	1564-VL(N95aH)	98	116	136	162	165	167	169
406	1564-VL(N95aK)	98	116	161	162	165	167	169
407	1564-VL(N95aR)	98	116	161	162	165	167	169
408	1564-VH(N54D)	98	116	135	162	165	166	169
409	1564-VH(N54Q)	98	116	135	162	165	166	169

Различные вариабельные области тяжелой и легкой цепи, раскрытые здесь, представлены в Таблицах 5 и 6. Каждая вариабельная область может быть связана с константными областями тяжелой и легкой цепи с образованием соответствующих тяжелых и легких цепей интактного антитела. Примером комбинации вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, составляющих антитело против IGF1R по настоящему изобретению, может быть комбинация вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи с одинаковым названием клона, как описано в Таблице 5 и Таблице 6.

В одном конкретном примере настоящего изобретения антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент содержат по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из:

CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1-9,

CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:10-49,

CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:50-80;

CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:96-113,

CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:114-132, и

CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:133-161.

Конкретно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1-9, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:10-49, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:50-80, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:96-113, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:114-132, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:133-161.

Антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично распознают и связываются по меньшей мере с одной аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из Y775, P776, F778, R650, S791, L798, Glu779, L641, H808, E809, L813, V397, D435, W434, Y460 и C488 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:410. Конкретно, антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут связываться по меньшей мере с одним, выбранным из сайтов связывания 1-3 белка, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:410. Сайт связывания 1 содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Y775, P776, F778, R650, S791, L798 и Glu779, сайт связывания 2 содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из L641, H808, E809 и L813, и сайт связывания 3 содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из V397, D435, W434, Y460 и C488.

Вариабельная область тяжелой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может содержать каркасную область 1 тяжелой цепи (H-FR1), расположенную на N-конце H-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:81-84,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), расположенную между H-CDR1 и H-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:85-86,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), расположенную между H-CDR2 и H-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:87-91, и

каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), расположенную на С-конце H-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:92-95.

Вариабельная область легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может содержать каркасную область I легкой цепи (L-FR1), расположенную на N-конце L-CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:162-164,

каркасную область легкой цепи (L-FR2), расположенную между L-CDR1 и L-CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:165,

каркасную область легкой цепи (L-FR3), расположенную между L-CDR2 и L-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:166-168, и

каркасную область легкой цепи (L-FR4), расположенную на С-конце L-CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:169-171.

Каждая из вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи, раскрытых в Таблицах 5 и 6, могут быть использованы как отдельные доменные антитела, могут быть свободно скомбинированы друг с другом с образованием различных антител и связаны в одноцепочечной форме с получением одноцепочечных антител, таких как scFv.

В настоящем описании «доменное антитело» представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи. В одном воплощении две или более VH-области связаны ковалентной связью посредством пептидного линкера с образованием доменного антитела. Две VH-области этого бивалентного доменного антитела могут быть направлены на один и тот же антиген или на разные антигены.

Антигенсвязывающие фрагменты антител против IGF1R по настоящему изобретению могут представлять собой фрагмент антитела, выбранный из scFv, (scFv)₂,

scFv-Fc, Fab, Fab', F(ab')₂, минителя и диатела, включая фрагменты антител, содержащие один или более чем один гипервариабельный участок.

Среди антигенсвязывающих фрагментов, Fab содержит вариабельную область легкой цепи, вариабельную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи и первую константную область (CH1) тяжелой цепи и имеет один сайт связывания антигена. Fab' имеет шарнирную область в составе Fab, содержащую один или более чем один цистеиновый остаток, на С-конце домена CH1 тяжелой цепи. F(ab')₂-антитело получают связыванием двух Fab' с образованием дисульфидной связи между цистеиновыми остатками шарнирных областей Fab'.

Fv представляет собой минимальный фрагмент антитела, имеющий только вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, и включает одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv) и двуцепочечные вариабельные фрагменты (Fv). В двуцепочечном Fv вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи могут быть связаны нековалентными связями. В одноцепочечном Fv вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи связаны ковалентно, напрямую или через пептидный линкер, или связаны напрямую на С-конце с образованием структуры, подобной димеру scFv (di-scFv), такой как двуцепочечный Fv. В настоящем изобретении одноцепочечный Fv представляет собой единую полипептидную цепь антигенсвязывающей области, где вариабельные области тяжелой и легкой цепи связаны напрямую или через линкер, и может представлять собой по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из scFv, имеющего одну цепь, связанную с вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи, формы структуры, подобной димеру scFv (di-scFv), scFv-Fc, где вариабельная область тяжелой цепи, вариабельная область легкой цепи и Fc связаны в форме единой цепи, и тому подобного.

Пептидный линкер может быть таким, как описано выше, и может иметь длину, например, от 1 до 100 аминокислот, такую как от 2 до 50 или от 5 до 25 аминокислот, и пептидный линкер может иметь различную длину в пределах интервала, не влияющего на функцию антитела. Типы аминокислот, входящих в пептидный линкер, могут включать одну или более чем одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей, например, из Gly, Ser и Leu, и конкретные примеры включают остатки Gly и Ser или остатки Leu и Ser. В одном конкретном примере пептидный линкер может представлять собой (G4S)_n, где n представляет собой число повторений (G4S), представленное

целым числом от 1 до 10, таким как от 2 до 5, особенно 3 или 4. Примером пептидного линкера может быть пептид, состоящий из аминокислот SEQ ID NO:411 или 412.

SEQ ID NO:411: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS.

SEQ ID NO:412: GGGGSGGGGSGGGGS.

Одноцепочечный Fv (scFv) может быть получен слиянием ДНК, кодирующей пептидный линкер, между ДНК, кодирующими полипептиды двух переменных доменов (VL и VH). Полученный полипептид может образовывать антигенсвязывающие мономеры или мультимеры (например, димеры, тримеры или тетрамеры), в зависимости от длины гибкого линкера между двумя переменными доменами, с формированием их пространственной структуры. При комбинировании полипептидов, содержащих разные VL и VH, могут быть получены мультимерные scFv, связывающиеся с разными эпитопами.

Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием протеолитических ферментов (например, рестрикционное расщепление полноразмерного антитела папаином с получением Fab и расщепление пепсином с получением F(ab')₂-фрагмента) или с применением генетической рекомбинантной технологии.

Одноцепочечные антитела, раскрытые в настоящем описании, включают, без ограничения, scFv, содержащие комбинации доменов переменных областей тяжелой и легкой цепи или комбинации переменных доменов легкой и тяжелой цепи, содержащие CDR.

Кроме того, антитело против IGF1R и его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи, и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи. Конкретно, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи могут быть связаны с константной областью тяжелой цепи и константной областью легкой цепи, и последовательности тяжелой цепи и легкой цепи можно также комбинировать с получением структуры интактного антитела.

Последовательности константных областей, которые можно комбинировать с переменными областями по настоящему изобретению, приведены в качестве примера и могут быть надлежащим образом выбраны из константных областей тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов (например, человеческих иммуноглобулинов). Например, без ограничения, константная область тяжелой цепи может представлять

собой константную область тяжелой цепи IgG1, константную область тяжелой цепи IgG3 или константную область тяжелой цепи IgG4, а константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или константную область легкой цепи лямбда.

В качестве примера, переменная область по настоящему изобретению может быть связана с константной областью с образованием последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи, описанных ниже. В Таблице 7 показаны примеры комбинаций тяжелых и легких цепей. Кроме того, примеры полноразмерных антител приведены в Таблице 16. Константная область может быть надлежащим образом выбрана из константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи иммуноглобулина (например, человеческого иммуноглобулина).

[Таблица 7] Примеры антител

	HC SEQ ID	LC SEQ ID
1564 IgG	413	420
1226 IgG	414	421
996 IgG	415	422
48G5 IgG	416	423
54H4 IgG	417	424
60H6 IgG	418	425
B11 IgG	419	426
1564 scFv	427	
1226 scFv	428	
996 scFv	429	
48G5 scFv	430	
54H4 scFv	431	
60H6 scFv	432	
B11 scFv	433	

Антитела, описанные в настоящем изобретении, также включают биспецифичные антитела и бифункциональные антитела, содержащие один или более чем один CDR или одну или более чем одну переменную область, как описано выше. Биспецифичные или бифункциональные антитела представляют собой искусственные гибридные антитела, распознающие две разные родственные или неродственные мишени. Биспецифичные антитела могут быть получены с применением множества методов, таких как слияние гибридом или лигирование Fab'-фрагментов.

В настоящем описании «мультиспецифичный антигенсвязывающий белок» или «мультиспецифичное антитело» направлены на два или более чем два антигена или эпитопа. В настоящем описании «биспецифичные» антигенсвязывающий белок или антитело или антигенсвязывающий белок или антитело «с двойной специфичностью» представляют собой гибридный антигенсвязывающий белок или гибридное антитело, имеющие два (2) разных сайта связывания антигена. Это биспецифичное антитело является одной из разновидностей мультиспецифичного антигенсвязывающего белка или мультиспецифичного антитела, и оно может быть получено различными известными методами, например, такими методами, как слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов.

Мультиспецифичное антитело, например, антитело против IGF1R и его антигенсвязывающий фрагмент, из которых можно получить биспецифичное антитело, может содержать как антитело против IGF1R, так и его антигенсвязывающий фрагмент, например, полноразмерное антитело. Антигенсвязывающий фрагмент может быть выбран из группы, состоящей из доменных антител, scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab' и F(ab')₂.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела против IGF1R может быть связан с линкером, таким как пептидный линкер, или без него. Кроме того, тяжело- и легкоцепочечные части антигенсвязывающего фрагмента, такие как переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи scFv-фрагмента, могут также быть связаны с пептидным линкером или без него. Пептидный линкер может быть таким, как описано выше.

В биспецифичном антителе антитело против IGF1R и его антигенсвязывающие фрагменты могут выполнять функцию доставки второго связанного с ними антитела или антигенсвязывающего фрагмента, направленных на другие антигены или эпитопы,

через гематоэнцефалический барьер в головной мозг. Второе антитело может представлять собой, без ограничения, антитело, действующее в головном мозге.

Антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут иметь определенную общую область или последовательность с отличным от них вторым антителом. Например, антитело против IGF1R может иметь общую константную область или Fc-область с антителом или антигенсвязывающим фрагментом второго антитела.

Кроме того, структура биспецифичного антитела в настоящем изобретении включает бивалентную форму биспецифичного антитела, где scFv антитела против IGF1R связан с каждой Fc двух тяжелых цепей полноразмерного иммуноглобулина, например, на концах тяжелых цепей, напрямую или через линкер, и моновалентную форму биспецифичного антитела, где scFv антитела против IGF1R связан только с одним концом двух тяжелых цепей полноразмерного иммуноглобулина, напрямую или через линкер, однако моновалентное двойное антитело является предпочтительным.

Конкретно, в одном воплощении настоящего изобретения есть случай, когда период полувыведения клона моновалентной формы лучше, чем у клона бивалентной формы, а структура клона моновалентной формы представляет собой форму, где доменное антитело (scFv) против IGF1R связано только с концом одной тяжелой цепи интактного иммуноглобулина через линкер. Конкретно, антитело представляет собой гетеродимер, полученный методом «выступ во впадину» (Knob-In-Hole), содержащий две разные тяжелые цепи интактного иммуноглобулина, где одна тяжелая цепь имеет доменное антитело (scFv) против IGF1R, связанное с ее C-концом, а другая тяжелая цепь не имеет доменного антитела на ее C-конце.

В биспецифичном антителе второе антитело, связанное с антителом против IGF1R или его антигенсвязывающим фрагментом, может представлять собой человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело или выделенное антитело, специфично связывающееся с IGF1R. Второе антитело включает, без ограничения, полноразмерные антитела, биспецифичные антитела, минитела, доменные антитела, миметики антител (или синтетические антитела), слитые антитела (или конъюгаты антител) и их фрагменты.

Далее настоящее изобретение относится к антителу против *syn* и его антигенсвязывающему фрагменту.

Альфа-синуклеин, который может быть распознан антителом, предложенным в настоящем описании, может быть выбран из альфа-синуклеинов млекопитающих, человеческого альфа-синуклеина, альфа-синуклеина обезьяны (например, альфа-синуклеина резуса), мышинового альфа-синуклеина, крысиного альфа-синуклеина и тому подобного. Например, человеческий альфа-синуклеин может представлять собой, без ограничения, альфа-синуклеин (NCBI ID: NP_000336). Если в настоящем описании не указано иное, альфа-синуклеин может относиться к человеческому альфа-синуклеину, и антитела или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем описании, имеют свойство специфично связываться не только с человеческим альфа-синуклеином, но также с альфа-синуклеином обезьяны (например, резуса), крысиным альфа-синуклеином и/или мышинным альфа-синуклеином.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с С-концевой областью альфа-синуклеина, конкретно, с С-концевой областью, содержащей пептид, содержащий по меньшей мере 11 или 12 расположенных друг за другом аминокислот, включая остатки 110-120 или остатки 111-122 в SEQ ID NO:559 человеческого альфа-синуклеина. Было подтверждено, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут распознавать область распознавания антигена и связываться с агрегатами альфа-синуклеина с высокой аффинностью.

В настоящем описании «аффинность» или «степень аффинности» представляют собой силу взаимодействия между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и антигеном и могут определяться свойствами антигена, такими как размер, форма и/или заряд антигена, и последовательностями CDR и/или физико-химическими свойствами (гидрофильными/гидрофобными свойствами, электростатическими свойствами и так далее) антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Методы определения аффинности известны в области техники, и обычно, без ограничения, ее указывают как константу диссоциации (K_D).

В настоящем описании «специфичное связывание с альфа-синуклеином или агрегатами альфа-синуклеина» означает, что аффинность связывания с белком альфа-синуклеина или агрегатами альфа-синуклеина относительно высока по сравнению с другими антигенами и, например, константа диссоциации (K_D) может составлять от $0,1 \times 10^{-10}$ М до 2×10^{-10} М или от $0,05 \times 10^{-10}$ М до $0,3 \times 10^{-9}$ М в отношении агрегатов альфа-синуклеина, конкретно, фибрилл, протофибрилл и

олигомеров амилоида, в особенности фибрилл амилоида, как измерено, без ограничения, анализом Octet или анализом SPR.

Гуманизированные антитела к альфа-синуклеину, содержащие легкую цепь и тяжелую цепь по одному воплощению настоящего изобретения, например, Hu11F11 (ver.1), Hu11F11 (ver.2) и Hu11F11_ABL2-4, демонстрируют высокую активность в отношении стимуляции фагоцитарного захвата по сравнению с химерными антителами к альфа-синуклеину. В сравнении с химерным антителом к альфа-синуклеину, Hu11F11 (ver.1), Hu11F11 (ver.2), Hu11F11 (ver.3), Hu11F11 (ver.4) и ABL2-4 демонстрируют высокую активность в отношении ингибирования связывания фибрилл с мембраной нервных клеток. Hu11F11 (ver.2), Hu11F11 (ver.4) и ABL2-4 имеют высокую активность в отношении ингибирования распространения альфа-синуклеина, секретированного из клеток, сверхэкспрессирующих альфа-синуклеин, на другие нервные клетки по сравнению с химерным антителом к альфа-синуклеину и демонстрируют аффинность связывания с агрегатами альфа-синуклеина, например, сходную или превышающую активность химерного антитела к альфа-синуклеину, в клеточном анализе.

Антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению может ингибировать перенос агрегатов альфа-синуклеина, секретированных из нервной клетки в нервную систему субъекта, в другие нормальные клетки во внеклеточном пространстве и инфицирование нервных клеток (ингибировать передачу агрегатов от клетки к клетке) и обладает способностью стимулировать фагоцитарное действие микроглии на агрегаты альфа-синуклеина во внеклеточном пространстве. Агрегаты альфа-синуклеина распространяются от одной клетки к другой клетке подобно прионам, и альфа-синуклеин, в особенности агрегаты альфа-синуклеина, распространяется по головному мозгу, приводя к синуклеинопатиям в нормальных клетках. Поэтому агрегаты альфа-синуклеина токсичны для нейронов головного мозга, и хорошо известно, что они приводят к гибели нейронов головного мозга (нейродегенерации) и нейровоспалению. Соответственно, по мере распространения агрегатов альфа-синуклеина в различные части головного мозга гибель клеток головного мозга и нейровоспалительные реакции становятся более выраженными, приводя к гибели клеток головного мозга, расстройствам поведения и когнитивным расстройствам, которые отмечают при прогрессировании синуклеинопатий, таких как болезнь Паркинсона.

Соответственно, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению может предотвращать явление распространения агрегатов альфа-синуклеина в различные области головного мозга, ингибируя передачу альфа-синуклеина или агрегатов альфа-синуклеина между нервными клетками, и снижать уровень агрегатов альфа-синуклеина, являющихся важной причиной синуклеинопатий, уменьшая количество или устраняя сами агрегаты альфа-синуклеина во внеклеточной области нервных клеток нервной системы субъекта и стимулируя фагоцитарную активность микроглии, что приводит к снижению интенсивности гибели нервных клеток головного мозга и нейровоспалительных реакций, и, кроме того, ожидается, что оно будет улучшать, облегчать или предотвращать симптомы и прогрессирование синуклеинопатий, таких как болезнь Паркинсона.

Более того, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению имеет отличную активность по выполнению обеих из двух функций (1) ингибирования передачи альфа-синуклеина или агрегатов альфа-синуклеина между нервными клетками (см. результаты клеточного анализа, раскрытые в настоящем описании) и (2) снижения уровня агрегатов альфа-синуклеина в нервной системе головного мозга посредством стимуляции фагоцитарной активности клеток микроглии. В частности, поскольку антитела к альфа-синуклеину, проходящие в данный момент клинические исследования или опубликованные в научной литературе, обладают одной из двух активностей (1) и (2), есть основания предполагать, что антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению обладает преимуществом в отношении более эффективного предотвращения или лечения синуклеинопатий по сравнению с известными антителами к альфа-синуклеину. Таким образом, антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению имеет более высокую эффективность в отношении уменьшения количества и устранения агрегатов альфа-синуклеина и ингибирования действия агрегатов альфа-синуклеина как этиологического фактора и поэтому оно более эффективно при синуклеинопатиях или связанных с ними симптоматических заболеваниях (например, когнитивных расстройствах).

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, имеющие высокую аффинность в отношении агрегатов альфа-синуклеина, могут уменьшать образование агрегатов альфа-синуклеина, снижая посредством этого концентрацию агрегатов в головном мозге. Кроме того, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению с высокой аффинностью в

отношении агрегатов альфа-синуклеина могут уменьшать образование агрегатов альфа-синуклеина вне центральной нервной системы и, в конечном счете, изменять состояние равновесия между формами альфа-синуклеина, разграниченными ГЭБ, приводя посредством этого к снижению концентрации агрегатов альфа-синуклеина в центральной нервной системе.

Это является большим преимуществом в клинической практике, поскольку позволяет получить достаточную эффективность даже при введении более удобным способом, например, без ограничения, подкожной инъекцией. Кроме того, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут, без ограничения данной теорией, ингибировать образование агрегатов, удаляя мономеры, или устранять как мономеры, так и агрегаты.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, специфично связывающиеся с белками альфа-синуклеина или агрегатами альфа-синуклеина, могут не являться продуктами, встречающимися в природе (они могут быть продуктами, не встречающимися в природе, например, продуктами химического синтеза или рекомбинантного метода). Методики рекомбинации хорошо известны в области техники

В настоящем описании «антитело» обозначает полноразмерный иммуноглобулин любого изотипа или антигенсвязывающий фрагмент, который может конкурировать с полноразмерным антителом за связывание с антигеном-мишенью. Например, оно включает химерные, гуманизированные, полноразмерные человеческие антитела, антитела с двойной специфичностью или их антигенсвязывающие фрагменты. Само по себе антитело является одной из разновидностей антигенсвязывающих белков. Обычно полноразмерное антитело содержит по меньшей мере 2 полноразмерные тяжелые цепи и 2 полноразмерные легкие цепи, но в некоторых случаях антитело может содержать только тяжелые цепи.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь происхождение только от одного источника или представлять собой химерное антитело. Химерное антитело содержит часть, имеющую происхождение от двух типов разных антител, и описано более подробно ниже. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены с использованием гибридомы, методикой рекомбинантных ДНК или ферментативным или химическим разделением интактного антитела. Если в настоящем описании не указано иное, термин «антитело» включает антитела, содержащие 2

полноразмерные тяжелые цепи и 2 полноразмерные легкие цепи, и их производные, варианты, фрагменты и мутанты, и их примеры описаны ниже.

В одном воплощении антитело включает, без ограничения, моноклональное антитело, биспецифичное антитело, минитело, доменное антитело, миметик антитела (или синтетическое антитело), химерное антитело, гуманизованное антитело, человеческое антитело, слитое антитело (или конъюгат антитела), их фрагменты и различные типы антител, раскрытые здесь. В одном воплощении фрагменты антител, раскрытые здесь, могут представлять собой Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fv-фрагменты, одноцепочечные фрагменты (scFv), диатело или молекулу одноцепочечного антитела из одной цепи, полученной соединением варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи через спейсер.

В настоящем описании «легкая цепь» включает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность варибельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания с антигеном или эпитопом. Полноразмерная легкая цепь содержит домен варибельной области VL и домен константной области CL. Домен варибельной области легкой цепи присутствует на N-конце полипептида легкой цепи. Типы легкой цепи включают цепи каппа и лямбда.

В настоящем описании «тяжелая цепь» включает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты, имеющие последовательность варибельной области, достаточную для обеспечения специфичности связывания с антигеном или эпитопом. Полноразмерная тяжелая цепь содержит домен варибельной области VH и три (3) домена константных областей CH1, CH2 и CH3. Домен VH присутствует на N-конце полипептида тяжелой цепи, а домены CH присутствуют на C-конце, при этом CH3 расположен ближе всех к C-концу. Тяжелая цепь включает IgG (включая подтипы IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2) и изоформы IgM и IgE.

В настоящем описании «антигенсвязывающий фрагмент» обозначает часть антитела, обладающую специфичной аффинностью связывания с антигеном, и/или полипептид, содержащий такую часть. Например, антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой часть антитела, содержащую аминокислотный остаток, придающий антителу специфичность и/или аффинность в отношении антигена посредством его взаимодействия с антигеном (например, эпитопом), или полипептид,

содержащий такую часть. Этот антигенсвязывающий фрагмент обычно содержит одну или более чем одну «определяющую комплементарность (CDR)», а также одну или более чем одну «каркасную область (FR)». CDR представляют собой аминокислотные последовательности, способствующие специфичности и аффинности связывания антитела с антигеном, а каркасные области представляют собой аминокислотные последовательности, способствующие поддержанию подходящей конформации этих CDR, и содействуют связыванию антигенсвязывающей области с антигеном.

При использовании в настоящем описании «антигенсвязывающий фрагмент» цепи (тяжелой цепи или легкой цепи) антитела или иммуноглобулина включает часть антитела, которая не имеет некоторых аминокислот по сравнению с полноразмерной цепью, но может специфично связываться с антигеном. Этот фрагмент можно рассматривать как обладающий биологической активностью, в том аспекте, что он может специфично связываться с антигеном-мишенью или может конкурировать с другими антителами или антигенсвязывающими фрагментами за связывание с определенным эпитопом. В одном аспекте данный фрагмент содержит по меньшей мере одну CDR, присутствующую в полноразмерной легкой цепи или тяжелой цепи, и в некоторых воплощениях он содержит одну цепь из тяжелой цепи и/или легкой цепи или ее часть. Этот биологически активный фрагмент может быть получен методикой рекомбинантных ДНК или может быть получен, например, ферментативным или химическим разделением интактного антитела. Иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина включает, без ограничения, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, доменное антитело и одноцепочечное антитело (например, scFv, scFv-Fc и так далее) и может иметь происхождение от любого млекопитающего, включая, без ограничения, человека, мышь, крысу, представителей семейства верблюдовых или кролика. Функциональная часть антитела, такая как одна или более чем одна CDR, описанные здесь, может быть связана с вторичным белком или низкомолекулярным соединением ковалентной связью и использована в качестве терапевтического агента, направленного на определенную мишень.

В настоящем описании «Fab-фрагмент» состоит из одной легкой цепи и одной тяжелой цепи, содержащей только переменную область и CH1. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой тяжелой цепью.

В настоящем описании «Fc-область» содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены CH2 и CH3 антитела. Эти 2 фрагмента тяжелой цепи связаны друг

с другим двумя или более дисульфидными связями и гидрофобным взаимодействием доменов СНЗ.

В настоящем описании «Fab'-фрагмент» дополнительно содержит, помимо Fab-фрагмента, область между доменами СН1 и СН2 тяжелой цепи, и между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов может быть образована дисульфидная связь.

В настоящем описании «F(ab')₂-фрагмент» содержит две легких цепи и две тяжелых цепи, содержащие переменную область, СН1 и часть константной области между доменами СН1 и СН2, как указано выше, и между 2 тяжелыми цепями образована межцепочечная дисульфидная связь. Таким образом, F(ab')₂-фрагмент состоит из двух Fab'-фрагментов, и эти два Fab'-фрагмента связаны друг с другом дисульфидной связью, образованной между ними.

В настоящем описании «Fv-область» представляет собой фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи и легкой цепи, но не содержащий константной области.

В настоящем описании «одноцепочечное антитело» представляет собой единую полипептидную цепь антигенсвязывающей области, образованную соединением переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи через гибкий линкер. Например, одноцепочечное антитело может представлять собой по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из scFv, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи связаны в одноцепочечной форме, scFv-Fc, где переменная область тяжелой цепи, переменная область легкой цепи и Fc связаны в одноцепочечной форме, и тому подобного. Одноцепочечное антитело может относиться, например, к патенту США № 5,260,203.

В настоящем описании «бивалентный антигенсвязывающий белок» или «бивалентное антитело» содержит два сайта связывания антигена. Это бивалентное антитело может содержать два сайта связывания антигена, обладающих специфичностью в отношении одного и того же антигена, или может представлять собой антитело с двойной специфичностью, связывающееся с разными антигенами, соответственно. В настоящем описании «мультиспецифичный антигенсвязывающий белок» или «мультиспецифичное антитело» направлены на два или более чем два антигена или эпитопа.

В настоящем описании «биспецифичные» антигенсвязывающий белок или антитело или антигенсвязывающий белок либо антигенсвязывающий белок или

антитело «с двойной специфичностью» представляют собой гибридные антигенсвязывающий белок или антитело, имеющие два разных сайта связывания антигена. Такое биспецифичное антитело является разновидностью мультиспецифичного антигенсвязывающего белка или мультиспецифичного антитела и может быть получено различными известными методами, такими как слияние гибридом или слияние Fab'-фрагментов.

В настоящем описании «биспецифичные» антигенсвязывающий белок или антитело, антигенсвязывающий белок или антитело «с двойной специфичностью» представляют собой гибридные антигенсвязывающий белок или антитело, имеющие 2 разных сайта связывания антигена. Это биспецифичное антитело является одной из разновидностей мультиспецифичного антигенсвязывающего белка или мультиспецифичного антитела, и оно может быть получено различными известными методами, например, такими методами, как слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. Возможные ссылки включают, например, Songsivilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 1990, 79:315-321, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 1992, 148:1547-1553 и тому подобное. Два эпитопа, отличающиеся друг от друга, с которыми связываются два сайта связывания антигена, присутствующие в биспецифичном антигенсвязывающем белке или антителе, могут быть расположены на одном и том же белке-мишени или на разных белках-мишенях. В одном воплощении антитело по настоящему изобретению может иметь форму биспецифичного антитела, дополнительно включающего связывание с носителем для доставки антитела через гематоэнцефалический барьер. Один способ доставки лекарственных средств через гематоэнцефалический барьер включает использование систем доставки, таких как рецептор-опосредованный транцитоз, например, через переносчик глюкозы, переносчик аминокислот, рецептор инсулина или рецептор трансферрина в клетке.

В настоящем описании «конъюгат» обозначает химерную молекулу антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, раскрытых в настоящем описании, с другой молекулой, в особенности с переносчиками через гематоэнцефалический барьер или терапевтическим агентом, описанными ниже. В конъюгате антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению связаны с другими молекулами ковалентной связью или физическими силами, такими как силы Ван-дер-Ваальса или силы гидрофобного взаимодействия, капсулированием, заключением или комбинацией указанных методов. В конъюгате по одному

воплощению антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть соединены пептидным линкером.

Настоящее изобретение также включает одну или более чем одну аминокислотную последовательность, в существенной степени идентичную одной или более чем одной аминокислотной последовательности, раскрытой в настоящем описании. Существенная идентичность последовательности означает, что последовательность с изменением сохраняет эффекты, раскрытые в настоящем изобретении. В одном воплощении указанная последовательность идентична раскрытой вариабельной области тяжелой цепи приблизительно на 90%, 95% или 99%. В одном воплощении указанная последовательность идентична раскрытой вариабельной области легкой цепи приблизительно на 90%, 95% или 99%. Например, в случае варианта, демонстрирующего 90%-ю, 95%-ю или 99%-ю идентичность последовательности антитела или антигенсвязывающего фрагмента, раскрытых в настоящем изобретении, любое изменение последовательности происходит в каркасной области вариабельной области, но не в CDR.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, специфично связывающиеся с альфа-синуклеином или его агрегатами, по настоящему изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

В одном воплощении антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать следующие последовательности CDR:

CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:434 и SEQ ID NO:439,

CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:435-437 и 649 и SEQ ID NO:440-441,

CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:438 и SEQ ID NO:442,

CDR1 легкой цепи (L-CDR1), выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:443 и SEQ ID NO:446,

CDR2 легкой цепи (L-CDR2), выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:444 и SEQ ID NO:447, и

CDR3 легкой цепи (L-CDR3), выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:445 и SEQ ID NO:448.

Аминокислотные последовательности CDR1-CDR3 тяжелой цепи и аминокислотные последовательности CDR1-CDR3 легкой цепи изложены в Таблицах 8 и 9.

[Таблица 8] Аминокислотные последовательности CDR1-CDR3 тяжелой цепи

Идентификатор клона	SEQ ID NO:	VH_CDR1 Аминокислотная последователь- ность	SEQ ID NO:	VH_CDR2 Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	VH_CDR3 Аминокислотная последовательность
ch11F11-VH	434	GFTFSDFYME	435	ASRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH1	434	GFTFSDFYME	436	AIRNKANDYTTEYAASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH2	434	GFTFSDFYME	436	AIRNKANDYTTEYAASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH3	434	GFTFSDFYME	649	AIRNKANDYTTEYADSVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH4	434	GFTFSDFYME	649	AIRNKANDYTTEYADSVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VHv3	434	GFTFSDFYME	437	ATRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11- VHv1mul newmu	434	GFTFSDFYME	437	ATRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VHv3 newmu	434	GFTFSDFYME	437	ATRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH-v1	434	GFTFSDFYME	435	ASRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH-v2	434	GFTFSDFYME	435	ASRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH-v3	434	GFTFSDFYME	435	ASRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
Hu11F11-VH-v4	434	GFTFSDFYME	435	ASRNKANDYTTEYSASVKG	438	DAHGKPFAY
ch3A9-VH	439	GFTFSSYAMS	440	TISNGGGYTYYPDSVKG	442	HITTVRPTKYFDY
Hu3A9-VH1	439	GFTFSSYAMS	440	TISNGGGYTYYPDSVKG	442	HITTVRPTKYFDY
Hu3A9-VH2	439	GFTFSSYAMS	441	TISNGGGYTYYADSVKG	442	HITTVRPTKYFDY
Hu3A9-VH3	439	GFTFSSYAMS	440	TISNGGGYTYYPDSVKG	442	HITTVRPTKYFDY
Hu3A9-VH4	439	GFTFSSYAMS	441	TISNGGGYTYYADSVKG	442	HITTVRPTKYFDY
Hu3A9-VH-v1	439	GFTFSSYAMS	440	TISNGGGYTYYPDSVKG	442	HITTVRPTKYFDY
Hu3A9-VH-v2	439	GFTFSSYAMS	440	TISNGGGYTYYPDSVKG	442	HITTVRPTKYFDY

[Таблица 9] Аминокислотные последовательности CDR1-CDR3 легкой цепи

Идентификатор клона	SEQ ID NO:	VL_CDR1 Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	VL_CDR1 Аминокислотная последователь- ность	SEQ ID NO:	VL_CDR1 Аминокислотная последователь- ность
ch11F11-VL	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL1	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL2	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL3	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL4	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
Hu11F11-VL5	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
Hu11F11-VLv3 4c	443	KSSQSLLYSSNQKNYLA	444	WASTRES	445	QQYYSYPWT
ch3A9-VL	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL1	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL2	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL3	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL4	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL-v1	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL-v2	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT
Hu3A9-VL-v2	446	KASQNVGTTVA	447	SASNRYT	448	QQYSNYPLT

В одном воплощении антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:434, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:435-437 и 649, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:438, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:443, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:444, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:445.

Кроме того, в одном воплощении антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать переменную область тяжелой цепи,

содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:439, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO:440-441, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:442, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:446, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:447, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:448.

В другом воплощении антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать:

каркасную область тяжелой цепи (H-FR1), расположенную на N-конце H-CDR1, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:449-450 и SEQ ID NO:468-473,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), расположенную между H-CDR1 и H-CDR2, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:451-452 и SEQ ID NO:474-477,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), расположенную между H-CDR2 и H-CDR3, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:453-464 и SEQ ID NO:478-483,

каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), расположенную на C-конце H-CDR3, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:465-467 и SEQ ID NO:484-485,

каркасную область легкой цепи (L-FR1), расположенную на N-конце L-CDR1, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:486-491 и SEQ ID NO:504-510,

каркасную область легкой цепи (L-FR2), расположенную между L-CDR1 и L-CDR2, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:492-494 и SEQ ID NO:511-514,

каркасную область легкой цепи (L-FR3), расположенную между L-CDR2 и L-CDR3, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:495-500 и SEQ ID NO:515-521, и/или

каркасную область легкой цепи (L-FR4), расположенную на С-конце L-CDR3, содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:501-503 и SEQ ID NO:522.

Как аминокислотные последовательности, полезные здесь в качестве каркасных областей, примеры последовательностей каркасных областей тяжелой цепи приведены в Таблицах 3 и 4, а примеры последовательностей каркасных областей легкой цепи приведены в Таблицах 10 и 11.

[Таблица 10] Аминокислотные последовательности каркасных областей 1-2 тяжелой цепи

Клон	SEQ ID NO:	Последовательность VH-FR1	SEQ ID NO:	Последовательность VH-FR2
ch11F11-VH	449	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATS	451	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH1	471	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	452	WVRQAPGKGLEWIA
Hu11F11-VH2	471	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	452	WVRQAPGKGLEWIA
Hu11F11-VH3	471	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	475	WVRQAPGKGLEWIA
Hu11F11-VH4	471	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	452	WVRQAPGKGLEWVA
Hu11F11-VHv3	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	451	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VHv1mul newmu	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	451	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VHv3 newmu	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	451	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v1	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	451	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v2	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	451	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v3	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	451	WVRQPPGKRLEWIA
Hu11F11-VH-v4	450	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	451	WVRQPPGKRLEWIA
ch3A9-VH	468	EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAAS	474	WVRQTPEKRLEWVA
Hu3A9-VH1	469	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	475	WVRQAPGKGLEWVA
Hu3A9-VH2	470	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS	476	WVRQAPDKGLEWVA
Hu3A9-VH3	471	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	475	WVRQAPGKGLEWVA
Hu3A9-VH4	471	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	475	WVRQAPGKGLEWVA
Hu3A9-VH-v1	472	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	477	WVRQTPEKGLEWVA
Hu3A9-VH-v2	473	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSAAS	477	WVRQTPEKGLEWVA

[Таблица 11] Аминокислотные последовательности каркасных областей 3-4 тяжелой цепи

Клон	SEQ ID NO:	Последовательность VH-FR3	SEQ ID NO:	Последовательность VH-FR4
ch11F11-VH	453	RFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDTAIYY CAR	465	WGQGTLVTVSA
Hu11F11-VH1	454	RFTVSRDTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCAR	466	WGQGTLVTVSS
Hu11F11-VH2	455	RFTISRDTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCAR	466	WGQGTLVTVSS
Hu11F11-VH3	456	RFTVSRDTSQNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAR	466	WGQGTLVTVSS
Hu11F11-VH4	457	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCSR	466	WGQGTLVTVSS
Hu11F11-VHv3	458	RFTISRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYY CAR	467	WGQGTTVTVSS
Hu11F11-VHv1mul newmu	459	RFTISRDTSQSSLYLQMNSLKTEDTAVY YCAR	467	WGQGTTVTVSS
Hu11F11-VHv3 newmu	460	RFTISRDTSQSSLYLQMNSLRAEDTAIYY CAR	467	WGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v1	461	RFTISRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYY CAR	467	WGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v2	462	RFTVSRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIY YCAR	467	WGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v3	463	RFTISRDTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYY CAR	467	WGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v4	464	RFTVSRDTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIY YCAR	467	WGQGTTVTVSS
ch3A9-VH	478	RFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMY YCAR	484	WGQGTTLVTVSS
Hu3A9-VH1	479	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDSAMY YCAR	485	WGQGTLVTVSS
Hu3A9-VH2	480	RFTISRDNKNTLYLQMSSLKAEDSAVY YCAR	485	WGQGTLVTVSS
Hu3A9-VH3	481	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAR	485	WGQGTLVTVSS

Hu3A9-VH4	482	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCAR	485	WGQGTTLTVSS
Hu3A9-VH-v1	483	RFTISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAMY YCAR	484	WGQGTTLTVSS
Hu3A9-VH-v2	483	RFTISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAMY YCAR	484	WGQGTTLTVSS

[Таблица 12] Аминокислотные последовательности каркасных областей 1-2

легкой цепи

Клон	SEQ ID NO:	Последовательность VL-FR1	SEQ ID NO:	Последовательность VL-FR2
ch11F11-VL	486	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSC	492	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu11F11-VL1	487	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	493	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VL2	488	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTITC	493	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VL3	489	DIVMTQSPSSLAVSLGERATINC	493	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VL4	490	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	494	WYQQKPGKAPKLLIY
Hu11F11-VL5	486	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSC	493	WYQQKPGQPPKLLIY
Hu11F11-VLv3 4c	491	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTMSC	492	WYQQKPGQSPKLLIY
ch3A9-VL	504	DIVMTQSPKFMSTSVGDRVSITC	511	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu3A9-VL1	505	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	512	WYQQKPGKAPKLLIY
Hu3A9-VL2	506	DIVMTQSPSTLSASVGDRVITC	513	AWYQQKPGKAPKLLIY
Hu3A9-VL3	507	DIVMTQSPATLSVSLGERATLSC	514	WYQQKPGQAPRLLIY
Hu3A9-VL4	508	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	512	WYQQKPGKAPKLLIY
Hu3A9-VL-v1	509	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	511	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu3A9-VL-v2	510	DIVMTQSPSSMSTSVGDRVITC	511	WYQQKPGQSPKLLIY
Hu3A9-VL-v2	510	DIVMTQSPSSMSTSVGDRVITC	511	WYQQKPGQSPKLLIY

[Таблица 13] Аминокислотные последовательности каркасных областей 3-4

легкой цепи

Клон	SEQ ID NO:	Последовательность VL-FR3	SEQ ID NO:	Последовательность VL-FR4
ch11F11-VL	495	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAV YYC	501	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VL1	496	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYC	502	FGGGTKVEIK
Hu11F11-VL2	497	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA VYYC	501	FGGGTKLEIK

Hu11F11-VL3	496	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYC	501	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VL4	498	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYC	503	FGQGTKVEIK
Hu11F11-VL5	499	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAV YYC	501	FGGGTKLEIK
Hu11F11-VLv3 4c	500	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDVA VYYC	501	FGGGTKLEIK
ch3A9-VL	515	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLA DYFC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL1	516	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL2	517	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFASY YC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL3	518	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL4	519	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL-v1	520	GVPDRFSGSGSGTDFTFITISSMQSEDIAT YFC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL-v2	521	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSMQSEDLAD YYC	522	FGAGTKLELR
Hu3A9-VL-v2	521	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSMQSEDLAD YYC	522	FGAGTKLELR

В другом воплощении антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую аминокислоту, выбранную из SEQ ID NO:434 и SEQ ID NO:439, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащую аминокислоту, выбранную из SEQ ID NO:435-437 и 649 и SEQ ID NO:440-441, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащую аминокислоту, выбранную из SEQ ID NO:438 и SEQ ID NO:442,

где переменная область тяжелой цепи дополнительно содержит каркасную область тяжелой цепи (H-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:449-450 и SEQ ID NO:468-473, каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:451-452 и SEQ ID NO:474-477, каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:453-464

и SEQ ID NO:478-483, и каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:465-467 и SEQ ID NO:484-485. Более конкретно, переменная область тяжелой цепи содержит каркасную область тяжелой цепи (H-FR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:450, каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:451, каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:462-464, и каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:467.

Кроме того, антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:443 и SEQ ID NO:446, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:444 и SEQ ID NO:447, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:445 и SEQ ID NO:448,

где переменная область легкой цепи дополнительно содержит каркасную область легкой цепи (L-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:486-491 и SEQ ID NO:504-510, каркасную область легкой цепи (L-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:492-494 и SEQ ID NO:511-514, каркасную область легкой цепи (L-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:495-500 и SEQ ID NO:515-521, и каркасную область легкой цепи (L-FR4), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:501-503 и SEQ ID NO:522. Более конкретно, переменная область легкой цепи содержит каркасную область легкой цепи (L-FR1), содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:491, каркасную область легкой цепи (L-FR2), содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:492, каркасную область легкой цепи (L-FR3), содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:500, и каркасную область легкой цепи (L-FR4), содержащую полипептидный фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:501.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному воплощению настоящего изобретения могут содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:434, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:435-437 и 649, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:438, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:443, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:444, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:445,

где переменная область тяжелой цепи содержит каркасную область тяжелой цепи (H-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:449,450 и 471, каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:451, 452 и 475, каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:453-464, и каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:465-467, и

где переменная область легкой цепи содержит каркасную область легкой цепи (L-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:486-491, каркасную область легкой цепи (L-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:492-494, каркасную область легкой цепи (L-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:495-500, и каркасную область легкой цепи (L-FR4), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:501-503.

Предпочтительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному воплощению настоящего изобретения содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1-CDR3 тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:434, 435 и 438, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1-CDR3 легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO:443, 444 и 445, где переменная область тяжелой цепи содержит каркасную область 1 тяжелой цепи (H-FR1), содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:450, каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:451, каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:462-464, и каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:467, и переменная область легкой цепи содержит каркасную область 1 легкой цепи (L-FR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:491, каркасную область легкой цепи (L-FR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:492, каркасную область легкой цепи (L-FR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:500, и каркасную область легкой цепи (L-FR4), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:501.

Антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент согласно одному воплощению настоящего изобретения содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:439, CDR2 тяжелой цепи (H-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:440-441, и CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:442, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:446, CDR2 легкой цепи (L-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:447, и CDR3 легкой цепи (L-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:448,

где переменная область тяжелой цепи содержит каркасную область 1 тяжелой цепи (H-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:463-473, каркасную область тяжелой цепи (H-FR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:474-477, каркасную область тяжелой цепи (H-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:478-483, и каркасную область тяжелой цепи (H-FR4), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:484-485, и

где переменная область легкой цепи содержит каркасную область 1 легкой цепи (L-FR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:504-510, каркасную область легкой цепи (L-FR2), содержащую

аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:511-514, каркасную область легкой цепи (L-FR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:515-521, и каркасную область легкой цепи (L-FR4), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:522.

В полноразмерных формах легкой цепи и тяжелой цепи переменная область и константная область соединены «J-областью» длиной приблизительно 12 или более аминокислот, а тяжелая цепь также содержит «D-область» длиной приблизительно 10 или более аминокислот. Возможные ссылки включают, например, *Fundamental Immunology*, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press. Обычно пара из переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи антитела могут образовывать антигенсвязывающую область.

Переменная область цепи иммуноглобулина обычно имеет одну и ту же общую структуру и содержит относительно консервативные каркасные области (FR), соединенные тремя гиперпеременными участками, называемыми «областями или доменами, определяющими комплементарность», или CDR. CDR переменных областей каждой цепи, образующей пару «тяжелая цепь / легкая цепь», обычно выровнены каркасными областями с образованием структуры, специфично связывающейся с определенным эпитопом белка-мишени (альфа-синуклеина). Эти элементы встречающихся в природе переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи обычно включены в следующем порядке от N-конца к C-концу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Положение аминокислотных последовательностей, соответствующих каждому из этих элементов, в переменной области, обозначают в соответствии с системой нумерации Kabat (*Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (в редакциях от 1987 г. и 1991 г., NIH, Bethesda, MD)) или Chothia & Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196 : 901-917; Chothia et al., 1989, *Nature* 342: 878-883.

Различные переменные области тяжелой цепи и переменные области легкой цепи, раскрытые здесь, показаны в Таблицах 14 и 15. Каждая из этих переменных областей может быть соединена с константной областью тяжелой цепи и константной областью легкой цепи с образованием тяжелой цепи и легкой цепи интактного антитела. Кроме того, полученные последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи можно также сочетать, образуя структуру полноразмерного антитела. Например, антитело против альфа-синуклеина или его

антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:523-534 или SEQ ID NO:535-541, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:542-548 или SEQ ID NO:549-556, и, конкретнее, переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:523-534, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:542-548, или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:535-541, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:549-556.

В одном конкретном воплощении настоящего изобретения антитело против альфа-синуклеина или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:531-534, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:548 (например, Hu11F11 (ver.1), Hu11F11 (ver.2), Hu11F11 (ver.3), Hu11F11 (ver.4) и так далее), или могут содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:525, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:546 (например, антитело Hu11F11 (ABL2-4)).

Примеры аминокислотных последовательностей переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно одному воплощению приведены в Таблицах 14 и 15.

[Таблица 14] Переменная область тяжелой цепи (VH)

Клон	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
ch11F11-VH	523	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAAS RNKANDYTTEYSASVKGRFIVSRDTSQSILYLQMNALRAEDTAIYYCARD HGKPFAYWGQGLTVTSA

Hu11F11-VH1	524	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPGKGLEWIAAI RNKANDYTTEYAASVKGRFTVSRDTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARD AHGKPFAYWGQGLTVTVSS
Hu11F11-VH2	525	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPGKGLEWIAAI RNKANDYTTEYAASVKGRFTISRDTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARDA HGKPFAYWGQGLTVTVSS
Hu11F11-VH3	526	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPGKGLEWIAAI RNKANDYTTEYADSVKGRFTVSRDTSQNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD AHGKPFAYWGQGLTVTVSS
Hu11F11-VH4	527	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPGKGLEWVAAI RNKANDYTTEYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRDA AHGKPFAYWGQGLTVTVSS
Hu11F11-VHv3	528	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAAT RNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDA HGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11- VHv1mul newmu	529	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAAT RNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDTSQSSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARDA HGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VHv3 newmu	530	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAAT RNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDTSQSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDA HGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v1	531	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAAS RNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDA HGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v2	532	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAAS RNKANDYTTEYSASVKGRFTVSRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDA HGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v3	533	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAAS RNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDA HGKPFAYWGQGTTVTVSS
Hu11F11-VH-v4	534	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAAS RNKANDYTTEYSASVKGRFTVSRDTSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDA HGKPFAYWGQGTTVTVSS
ch3A9-VH	535	EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATI SNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCARHITT VRPTKYFDYWGQGTTLTVSS
Hu3A9-VH1	536	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATI SNGGGYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDSAMYYCARHITT VRPTKYFDYWGQGLTVTVSS

Hu3A9-VH2	537	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPDKGLEWVATI SNGGGYTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKAEDSAVYYCARHITT VRPTKYFDYWGQGLTVTVSS
Hu3A9-VH3	538	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATI SNGGGYTTYPDsvkgrftISRDNskntlylQMNSLRAEDTAVYYCARHITT VRPTKYFDYWGQGLTVTVSS
Hu3A9-VH4	539	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATI SNGGGYTTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARHITT VRPTKYFDYWGQGLTVTVSS
Hu3A9-VH-v1	540	EVQLLESggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqtpekglewvati SNGGGYTTYPDsvkgrftISRDNskntlylQMSSLRAEDTAMYYCARHITT VRPTKYFDYWGQGTTLTVSS
Hu3A9-VH-v2	541	EVQLLESggglvqpggslklSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKGLEWVATI SNGGGYTTYPDsvkgrftISRDNskntlylQMSSLRAEDTAMYYCARHITT VRPTKYFDYWGQGTTLTVSS
ch9B11-VH	557	EVQLQESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMlylQMNNLKTEDTAMYYCVR QDFDYWGQGTTLTVSS

[Таблица 15] Варибельная область легкой цепи (VL)

Клон	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
ch11F11-VL	542	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPK LLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSSYPWT FGGGTKLEIK
Hu11F11-VL1	543	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSSYPWTF GGGTKVEIK
Hu11F11-VL2	544	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQQYYSSYPWTF GGGTKLEIK
Hu11F11-VL3	545	DIVMTQSPSSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSSYPWTF GGGTKLEIK
Hu11F11-VL4	546	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSSYPWTFG QGTKVEIK
Hu11F11-VL5	547	DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPK

		LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQQYYSSYPWT FGGGTKLEIK
Hu11F11-VLv3 4c	548	DIVMTQSPSSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPK LLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDVAVYYCQQYYSSYPWT FGGGTKLEIK
ch3A9-VL	549	DIVMTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTTVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS NRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSNYPLTFGAGTKL ELR
Hu3A9-VL1	550	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS NRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSNYPLTFGGGKLE IK
Hu3A9-VL2	551	DIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS NRYTGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFASYYCQQYSNYPLTFGQGKVE IK
Hu3A9-VL3	552	DIVMTQSPATLSVSLGERATLSCKASQNVGTTVAWYQQKPGQAPRLLIYSAS NRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYSNYPLTFGGGKVE IK
Hu3A9-VL4	553	DIQMTQSPSSLSA – SVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSNYPLTFGQGK VEIK
Hu3A9-VL-v1	554	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS NRYTGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSMQSEDIATYFCQQYSNYPLTFGQGKLE IK
Hu3A9-VL-v2	555	DIVMTQSPSSMSTSVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS NRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSMQSEDIADYYCQQYSNYPLTFGQGKLE EIK
Hu3A9-VL-v2	556	DIVMTQSPSSMSTSVGDRVTITCKASQNVGTTVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS NRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSMQSEDLADYYCQQYSNYPLTFGQGKLE EIK
ch9B11-VL	558	DIVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLVHWYLVKPGQSPKLLI YKVSNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPLTFGA GTKLEQKR

Кроме того, антител, содержащих комбинацию варибельной области тяжелой цепи с варибельной областью легкой цепи и константную область антитела или антигенсвязывающего фрагмента по одному воплощению описаны в Таблице 16.

[Таблица 16] Примеры антител по настоящему изобретению

Название образца	Цепь	Аминокислотная последовательность
hu11F11 (ver.1)	Тяжелая (SEQ ID N O:560)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAA SRNKANDYTTTEYSASVKGRFTISRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARD AHGKPFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая (SEQ ID N O:566)	DIVMTQSPSSLAIVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDVAVYYCQQYYSYP WTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hu11F11 (ver.2)	Тяжелая (SEQ ID N O:561)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAA SRNKANDYTTTEYSASVKGRFTVSRDDSKSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR DAHGKPFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая (SEQ ID N O:566)	DIVMTQSPSSLAIVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDVAVYYCQQYYSYP WTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

hu11F11 (ver.3)	Тяжелая (SEQ ID N O:562)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAA SRNKANDYTTEYSASVKGRFTISRDTSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCARD AHGKPFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая (SEQ ID N O:566)	DIVMTQSPSSLAIVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDVAVYYCQQYYSYP WTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNRFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hu11F11 (ver.4)	Тяжелая (SEQ ID N O:563)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDFYMEWVRQPPGKRLEWIAA SRNKANDYTTEYSASVKGRFTVSRDTSSLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR DAHGKPFAYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая (SEQ ID N O:566)	DIVMTQSPSSLAIVSLGERVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDVAVYYCQQYYSYP WTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNRFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hu11F11 (H2L4)	Тяжелая (SEQ ID N O:564)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDFYMEWVRQAPGKGLEWIAA IRNKANDYTTEYAASVKGRFTISRDTSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR DAHGKPFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

	Легкая (SEQ ID N O:567)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPK LLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSPWT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
hu3A9 (VH5/L3)	Тяжелая (SEQ ID N O:565)	EVQLQESGGGLVPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPKGLEWVA TISNNGGTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCARHI TTVRPTKYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая (SEQ ID N O:568)	DIVMTQSPATLSVSLGERATLSCKASQNVGTTVAWYQQKPGQAPRLLIYS ASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYSNYPLTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

Для того чтобы переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи, описанные здесь, образовали тяжелую цепь и легкую цепь интактного антитела, каждая переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи может быть связана с константной областью тяжелой цепи и константной областью легкой цепи. Каждую из тяжелой цепи и легкой цепи, полученных как описано выше, можно надлежащим образом комбинировать с получением комбинации «тяжелая цепь – легкая цепь», и полученная комбинация «тяжелая цепь – легкая цепь» может образовывать мультимер (например, димер в случае антитела типа IgG), что приводит к построению структуры интактного антитела.

Константная область может быть надлежащим образом выбрана из константных областей тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов (например, человеческих иммуноглобулинов). Например, без ограничения, константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область тяжелой цепи IgG1, константную область тяжелой цепи IgG3 или константную область тяжелой цепи IgG4, а константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или константную область лямбда. Для стабильности антитела, простоты его получения, аффинности в отношении антигена и/или других желаемых характеристик могут быть

надлежащим образом выбраны и использованы другие типы константных областей или модифицированные константные области, которые очевидны специалистам в области техники.

В другом воплощении каждая из переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи, раскрытых в Таблицах 14 и 15, могут быть свободно скомбинированы друг с другом с образованием различных антител и связаны в одноцепочечной форме с получением одноцепочечных антител, таких как scFv.

Антитело, описанное здесь, может иметь определенную общую область или последовательность с другим антителом, раскрытым здесь. В одном воплощении антитело может иметь общую константную область с другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В другом воплощении оно может иметь общую Fc-область.

В одном воплощении антитело против альфа-синуклеина по настоящему изобретению также включает моноклональное антитело и поликлональное антитело. В другом воплощении антитело против альфа-синуклеина может представлять собой человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело или антитело, имеющее происхождение от животного. В другом воплощении антитело против альфа-синуклеина может быть получено рекомбинантным методом или химическим синтезом.

Антигенсвязывающие фрагменты или фрагменты антител, описанных здесь, могут представлять собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из молекул одноцепочечных антител scFv, (scFv)₂, scFv-Fc, Fab, Fab', F(ab')₂, минитела, диатела, scFv и тому подобного.

В другом воплощении антитело, предложенное здесь, может представлять собой гуманизированное антитело или человеческое антитело и может относиться к различным изотипам (например, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE или IgD), особенно к типам IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, таким как типы IgG1 или IgG2.

В другом воплощении антитело против альфа-синуклеина может содержать только тяжелую цепь или легкую цепь, описанные выше. В другом воплощении антитело против альфа-синуклеина имеет только переменную область тяжелой цепи или только переменную область легкой цепи.

Специалистам в данной области будет ясно, что, когда антитело содержит один или более чем один CDR, раскрытые здесь, каждый из раскрытых CDR можно

выбирать и комбинировать независимо от других. Таким образом, могут быть получены антитела, содержащие 1, 2, 3, 4, 5 или 6 независимо выбранных CDR. Специалистам в данной области также будет ясно, что, при выборе CDR для комбинации, CDR одного и того же типа не используют повторно и обычно не получают антитела, содержащие, например, два участка CDR-H2.

В одном воплощении антитело может представлять собой моноклональное антитело или поликлональное антитело. Антитела, раскрытые здесь, включают моноклональные антитела, связывающиеся с альфа-синуклеином. Моноклональные антитела могут быть получены с применением любой методики, известной в данной области. Например, они могут быть получены иммортализацией клеток селезенки, полученных от иммунизированных трансгенных животных. Моноклональные антитела, секретированные гибридными клеточными линиями, могут быть очищены с применением методик, известных в данной области.

В других воплощениях антитело может представлять собой антитело животного происхождения (например, мышинное антитело и так далее), химерное антитело (например, мышинное-человеческое химерное антитело), гуманизированное антитело или человеческое антитело. Антитело может также быть модифицировано различными способами для различных целей. Также предложены химерные антитела и гуманизированные антитела. Химерные антитела представляют собой антитела, в которых полипептидные фрагменты, имеющие происхождение от разных антител, ковалентно связаны с образованием иммунологически функциональных легкой цепи, тяжелой цепи или их фрагмента.

В таком моноклональном антителе определенный аминокислотный остаток, обычно входящий в состав части антитела, не участвующей в распознавании антигена, модифицирован, чтобы быть гомологичным соответствующему остатку изотипа, соответствующего человеческому антителу. Гуманизация может быть проведена различными известными методами, например, заменой по меньшей мере части варибельной области грызуна на соответствующую область человеческого антитела (патенты США №№ 5,585,089 и 5,693,762; Jones et al., Nature 1986, 321: 522-525; Riechmann et al., Nature 1988, 332: 323-27; Verhoeyen et al., Science 1988, 239: 1534-1536).

Полноразмерное человеческое антитело может быть получено иммунизацией трансгенного животного (обычно мыши), которое может вырабатывать человеческое

антитело ввиду отсутствия выработки эндогенного иммуноглобулина. Полноразмерное человеческое антитело может также иметь происхождение от фаговой дисплейной библиотеки. Использование полноразмерных человеческих антител позволяет минимизировать иммуногенные и аллергические реакции, которые могут быть вызваны введением человеку мышинового mAb или mAb мышинового происхождения.

В одном воплощении отбор человеческих антител к альфа-синуклеину по настоящему изобретению проводят методом фагового дисплея. Моноклональные фаговые антитела, специфичные в отношении альфа-синуклеина, отобранные методом фагового скрининга, превращают в полноразмерную форму IgG с применением рекомбинантного метода. Последовательность каждого моноклонального фагового антитела получают для рекомбинантного получения антител против альфа-синуклеина. После соединения последовательности варибельной области тяжелой цепи с последовательностью константной области тяжелой цепи и последовательности варибельной области легкой цепи с последовательностью константной области легкой цепи в полученных последовательностях, аминокислотные последовательности преобразуют в нуклеотидную последовательность методом оптимизации кодонов. После клонирования полученных нуклеотидных последовательностей в векторы, используемые для культивирования клеток животных, клетки-хозяева, используемые для получения белков, такие как клетки CHO, трансформируют полученными векторами и культивируют. Для очистки антител, присутствующих в культуральной среде, рекомбинантные антитела выделяют и очищают с применением методики очистки, такой как аффинная хроматография.

В другом воплощении антитело может иметь типичную структуру встречающегося в природе антитела или модифицированную структуру.

Антитело, имеющее типичную структуру, может иметь мультимерную структуру, включающую структурные единицы, содержащие две разные полипептидные цепи (то есть тяжелую цепь и легкую цепь). Указанные две разные полипептидные цепи включают одну полноразмерную легкую цепь (приблизительно 25 кДа) и одну полноразмерную тяжелую цепь (приблизительно 50-70 кДа). Каждая цепь имеет характерную пространственную структуру и состоит из нескольких иммуноглобулиновых доменов, состоящих из приблизительно 90-110 аминокислот. Эти домены являются основными структурами, из которых состоит полипептид антитела. N-концевая часть каждой цепи обычно содержит часть, называемую варибельной

областью или V-областью, которая представляет собой часть, распознающую антиген. С-концевая часть эволюционно более консервативна, чем N-концевая, и содержит часть, называемую константной областью или С-областью. Человеческую легкую цепь обычно классифицируют как легкие цепи каппа (κ) и лямбда (λ), и они содержат одну переменную область и одну константную область. Тяжелую цепь обычно классифицируют как цепь мю (μ), дельта (δ), гамма (γ), альфа (α) или эpsilon (ϵ), и их определяют как изоотипы IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. IgG включает многочисленные подтипы, в том числе, без ограничения, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Константная область тяжелой цепи обычно содержит один или более чем один домен, демонстрирующие эффекторную функцию. Число доменов в константной области тяжелой цепи варьирует в зависимости от изоотипа. Тяжелая цепь IgG, например, содержит три домена С-области, известные как CH1, CH2 и CH3, соответственно. Антитело, раскрытое здесь, может представлять собой антитело любого из этих изоотипов и подтипов. В одном воплощении антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело подтипа IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 или IgG4.

Агрегат альфа-синуклеина по настоящему изобретению специфично распознает агрегаты альфа-синуклеина с высокой аффинностью и специфичностью, указывая на то, что антитело к альфа-синуклеину может быть полезно для диагностики или выявления таких заболеваний. Кроме того, антитело к альфа-синуклеину, специфично распознающее агрегаты альфа-синуклеина, по настоящему изобретению ингибирует образование агрегатов альфа-синуклеина, разрушает агрегаты или ингибирует межклеточный перенос агрегатов, благодаря чему оно может быть полезным образом использовано для лечения синуклеинопатий, в частности болезни Паркинсона.

Примеры биспецифичных антител по настоящему изобретению показаны в Таблице 17.

[Таблица 17]

Биспецифичное антитело Идентификатор клона	Легкая цепь биспецифичного антитела	Комбинированная тяжелая цепь биспецифичного антитела	SEQ ID	Пояснения по тяжелой цепи биспецифичного антитела	SEQ ID
ch11F11-1564-3 bivalent	ch11F11-VL	ch11F11-1564-3 бивалентная (HC)	569	CH11F11 (IGG)-	640
				(G4S)3-	412
				1564-3 VL-	297
				(G4S)4-	411
				1564-3 VH	178

ch11F11-1564-2 bivalent	ch11F11-VL	ch11F11-1564-2 бивалентная (HC)	570	CH11F11 (IGG),	640
				(G4S)3,	412
				1564-2 VL,	296
				(G4S)4,	411
				1564-2 VH	177
ch11F11-1564-3 monovalent	ch11F11-VL	ch11F11-1564-3 моновалентная (HC 1, -впадина) (1564-3 scFv)	571	CH11F11 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВПАДИНА» АТ FC,	641
				(G4S)3,	412
				1564-3 VL,	297
				(G4S)4,	411
				1564-3 VH	178
		ch11F11-1564 моновалентная (HC 2, -выступ)	573	CH11F11 (IGG) WITH МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	573
ch11F11-1564-2 monovalent	ch11F11-VL	ch11F11-1564-2 моновалентная (HC 1, -впадина) (1564-2 scFv)	572	CH11F11 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВПАДИНА» АТ FC,	641
				(G4S)3,	412
				1564-2 VL,	296
				(G4S)4,	411
				1564-2 VH	177
		ch11F11-1564 моновалентная (HC 2, -выступ)	573	CH11F11 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВЫСТУП»	573
ch3A9-1564-3 bivalent	ch3A9-VL	ch3A9-1564-3 бивалентная (HC)	574	CH3A9 (IGG),	642
				(G4S)3,	412
				1564-3 VL,	297
				(G4S)4,	411
				1564-3 VH	178
ch3A9-1564-2 bivalent	ch3A9-VL	ch3A9-1564-2 бивалентная (HC)	575	CH3A9 (IGG),	642
				(G4S)3,	412
				1564-2 VL,	296
				(G4S)4,	411
				1564-2 VH	177
ch3A9-1564-3 monovalent	ch3A9-VL	ch3A9-1564-3 моновалентная (HC 1, -впадина)	576	CH3A9 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВПАДИНА» АТ FC	643
				(G4S)3,	412
				1564-3 VL,	297
				(G4S)4,	411

				1564-3 VH	178
		ch3A9-1564 моновалентная (НС 2, -выступ)	578	СН3А9 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВЫСТУП»	578
ch3A9-1564-3 monovalent	ch3A9-VL	ch3A9-1564-2 моновалентная (НС 1, -впадина)	577	СН3А9 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВПАДИНА» АТ FC,	643
				(G4S)3,	412
				1564-2 VL,	296
				(G4S)4,	411
		1564-2 VH	177		
		ch3A9-1564 моновалентная (НС 2, -выступ)	578	СН3А9 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВЫСТУП»	578
hu11F11(ver.2)-1564-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-1564-3 бивалентная (НС)	579	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				1564-3 VL,	297
				(G4S)4,	411
				1564-3 VH	178
hu11F11(ver.2)-1564-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-1564-2 бивалентная (НС)	580	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				1564-2 VL,	296
				(G4S)4,	411
				1564-2 VH	177
hu11F11(ver.2)-1564-3 monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-1564-3 моновалентная (НС 1, -впадина)	581	hu11F11(ver.2 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВПАДИНА» АТ FC,	645
				(G4S)3,	412
				1564-3 VL,	297
				(G4S)4,	411
		1564-3 VH	178		
		hu11F11(ver.2)-1564 моновалентная (НС 2, -выступ)	583	hu11F11(ver.2 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВЫСТУП»	583
hu11F11(ver.2)-1564-2 monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-1564-2 моновалентная (НС 1, -впадина)	582	hu11F11(ver.2 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВПАДИНА» АТ FC,	645
				(G4S)3,	412
				1564-2 VL,	296
				(G4S)4,	411

				1564-2 VH	177
		hu1F11(ver.2)-1564 моновалентная (HC 2, -выступ)	583	hu1F11(ver.2 (IGG) С МУТАЦИЕЙ ТИПА «ВЫСТУП»	583
**		человеческий IgG1 M428L mutated (CH1, CH2, CH3)	584	ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ IGG1 M428L МУТАЦИЯ AT FC	584
hu1F11(ver.2)(M428L))-1564-DMP bivalent	Hu1F11-VL _{v3} 4c	hu1F11(ver.2)(M428L))-1564-DMP bivalent(HC)	585	hu1F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				1564-DMP VL,	299
				(G4S)4,	411
		1564-DMP VH		180	
hu1F11(ver.2)(M428L))-1564-DM bivalent	Hu1F11-VL _{v3} 4c	hu1F11(ver.2)(M428L))-1564-DM bivalent (HC)	586	hu1F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				1564-DM VL,	298
				(G4S)4,	411
		1564-DM VH		179	
hu1F11(ver.2)(M428L))-1564-DMP monovalent	Hu1F11-VL _{v3} 4c	hu1F11(ver.2)(M428L))-1564-DMP моновалентная (HC 1, -впадина)	587	hu1F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				1564-DMP VL,	299
				(G4S)4,	411
		1564-DMP VH		180	
		hu1F11(ver.2)(M428L))-1564 monovalent, (HC 2, -выступ)	589	hu1F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu1F11(ver.2)(M428L))-1564-DM monovalent	Hu1F11-VL _{v3} 4c	hu1F11(ver.2)(M428L))-1564-DMP monovalent, (HC 1, - впадина)	588	hu1F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				1564-DM VL,	298
				(G4S)4,	411
		1564-DM VH		179	
		hu1F11(ver.2)(M428L))-1564 monovalent, (HC 2, -выступ)	589	hu1F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu1F11(ver.2)-C04-3 monovalent	Hu1F11-VL _{v3} 4c	hu1F11(ver.2)-C04-3 моновалентная (HC 1, -впадина)	590	hu1F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	645

				(G4S)3,	412
				C04-3 VL,	334
				(G4S)4,	411
				C04-3 VH	215
		hu11F11(ver.2)-C04 моновалентная (НС 2, -выступ)	583	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	583
hu11F11(ver.2)-C04-2 monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-C04-2 моновалентная (НС 2, -выступ)	591	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	645
				(G4S)3,	412
				C04-2 VL,	333
				(G4S)4,	411
		C04-2 VH	214		
		hu11F11(ver.2)-C04 моновалентная (НС 2, -выступ)	583	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	583
hu11F11(ver.2)-F06-03 monovalent		hu11F11(ver.2)-F06-3 моновалентная (НС 1, -впадина)	592	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	645
				(G4S)3,	412
				F06-3 VL,	339
				(G4S)4,	411
		F06-3 VH	220		
		hu11F11(ver.2)-C04 моновалентная (НС 2, -выступ)	583	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	583
hu11F11(ver.2)-F06-02 monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-F06-02 моновалентная (НС 1, -впадина)	593	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	645
				(G4S)3,	412
				F06-2 VL,	338
				(G4S)4,	411
		F06-2 VH	219		
		hu11F11(ver.2)-C04 моновалентная (НС 2, -выступ)	583	hu11F11(ver.2 (IGG), МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	583
hu11F11(ver.2)-VH2-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH2-3 бивалентная (НС)	594	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH2-3 VL,	356
				(G4S)4,	411
				VH2-3 VH	237
hu11F11(ver.2)-VH2-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH2-2 бивалентная (НС) 2	595	hu11F11(ver.2 (IGG),	644

				(G4S)3,	412
				VH2-2 VL,	355
				(G4S)4,	411
				VH2-2 VH	236
hu11F11(ver.2)-VH5-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH5-3 бивалентная (HC)	596	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH5-3 VL,	361
				(G4S)4,	411
				VH5-3 VH	242
hu11F11(ver.2)-VH5-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH5-2 бивалентная (HC)_2	597	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH5-2 VL,	360
				(G4S)4,	411
				VH5-2 VH	241
hu11F11(ver.2)-VH6-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH6-3 бивалентная (HC)	598	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH6-3 VL,	366
				(G4S)4,	411
				VH6-3 VH	247
hu11F11(ver.2)-VH6-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH6-2 бивалентная (HC)_2	599	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH6-2 VL,	365
				(G4S)4,	411
				VH6-2 VH	246
hu11F11(ver.2)-VH7-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH7-3 бивалентная (HC)	600	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH7-3 VL,	371
				(G4S)4,	411
				VH7-3 VH	252
hu11F11(ver.2)-VH7-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH7-2 бивалентная (HC)_2	601	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412
				VH7-2 VL,	370
				(G4S)4,	411
				VH7-2 VH	251
hu11F11(ver.2)-VH9-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH9 бивалентная (HC)	602	hu11F11(ver.2 (IGG),	644
				(G4S)3,	412

				VH9-3 VL, (G4S)4, VH9-3 VH	376 411 257
hu11F11(ver.2)-VH9-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH9 бивалентная (HC)_2	603	hu11F11(ver.2 (IGG), (G4S)3, VH9-2 VL, (G4S)4, VH9-2 VH	644 412 375 411 256
hu11F11(ver.2)-VH16-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH16 бивалентная (HC)	604	hu11F11(ver.2 (IGG), (G4S)3, VH16-3 VL, (G4S)4, VH16-3 VH	644 412 381 411 262
hu11F11(ver.2)-VH16-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH16 бивалентная (HC)_2	605	hu11F11(ver.2 (IGG), (G4S)3, VH16-2 VL, (G4S)4, VH16-2 VH	644 412 380 411 262
hu11F11(ver.2)-VH27 - 3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH27 бивалентная (HC)	606	hu11F11(ver.2 (IGG), (G4S)3, VH27-3 VL, (G4S)4, VH27-3 VH	644 412 386 411 267
hu11F11(ver.2)-VH27-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH27 бивалентная (HC)_2	607	hu11F11(ver.2 (IGG), (G4S)3, VH27-2 VL, (G4S)4, VH27-2 VH	644 412 385 411 266
hu11F11(ver.2)-VH32-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH32 бивалентная (HC)	608	hu11F11(ver.2 (IGG), (G4S)3, VH32-3 VL, (G4S)4, VH32-3 VH	644 412 391 411 272
hu11F11(ver.2)-VH32-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH32 бивалентная (HC)_2	609	hu11F11(ver.2 (IGG), (G4S)3, VH32-2 VL,	644 412 390

				(G4S)4,	411				
				VH32-2 VH	271				
hu11F11(ver.2)-VH35-3 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH35 бивалентная (HC)	610	hu11F11(ver.2 (IGG),	644				
				(G4S)3,	412				
				VH35-3 VL,	396				
				(G4S)4,	411				
				VH35-3 VH	277				
hu11F11(ver.2)-VH35-2 bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)-VH35 бивалентная (HC)_2	611	hu11F11(ver.2 (IGG),	644				
				(G4S)3,	412				
				VH35-2 VL,	395				
				(G4S)4,	411				
				VH35-2 VH	276				
hu11F11(ver.2)(M428L)-C04-DMP monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-C04-DMP моновалентная (HC 1, -впадина)	612	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647				
				(G4S)3,	412				
				C04-DMP VL,	336				
				(G4S)4,	411				
		hu11F11(ver.2)(M428L)-C04 (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2)(M428L)-C04 (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589		
						hu11F11(ver.2)(M428L)-C04-DM моновалентная (HC 1, -впадина)	613	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
								(G4S)3,	412
								C04-DM VL,	335
(G4S)4,	411								
hu11F11(ver.2)(M428L)-C04 (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2)(M428L)-C04 (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589				
				hu11F11(ver.2)(M428L)-F06-DMP моновалентная (HC 1, -впадина)	614	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647		
(G4S)3,	412								
F06-DMP VL,	341								
(G4S)4,	411								

				F06-DMP VH	222
		hu1F11(ver.2)(M428L)-F06 моновалентная (НС 2, -выступ)	589	hu1F11(ver.2)(IGG),M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu1F11(ver.2)(M428L)-F06-DM monovalent	Hu1F11-VLv3 4c	hu1F11(ver.2)(M428L)-F06-DM моновалентная (НС 1, -впадина)	615	hu1F11(ver.2)(IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				F06-DM VL,	340
				(G4S)4,	411
		F06-DM VH	221		
		hu1F11(ver.2)(M428L)-F06 monovalent, deamidated, S->P (НС 2, -выступ)	589	hu1F11(ver.2)(IGG),M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu1F11(ver.2)(M428L)-VH2-DMP bivalent	Hu1F11-VLv3 4c	hu1F11(ver.2)(M428L)-VH2-DMP бивалентная (НС)	616	hu1F11(ver.2)(IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH2-DMP VL,	358
				(G4S)4,	411
VH2-DMP VH	239				
hu1F11(ver.2)(M428L)-VH2-DM bivalent	Hu1F11-VLv3 4c	hu1F11(ver.2)(M428L)-VH2-DM бивалентная (НС)	617	hu1F11(ver.2)(IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH2-DM VL,	357
				(G4S)4,	411
VH2-DM VH	238				
hu1F11(ver.2)(M428L)-VH5-DMP bivalent, (НС)	Hu1F11-VLv3 4c	hu1F11(ver.2)(M428L)-VH5-DMP bivalent, (НС)	618	hu1F11(ver.2)(IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH5-DMP VL,	363
				(G4S)4,	411
VH5-DMP VH	244				
hu1F11(ver.2)(M428L)-VH5-DM bivalent, (НС)	Hu1F11-VLv3 4c	hu1F11(ver.2)(M428L)-VH5-DM bivalent, (НС)	619	hu1F11(ver.2)(IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH5-DM VL,	362
				(G4S)4,	411
VH5-DM VH	243				

hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5-DMP monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5-DMP monovalent, (HC 1, -впадина)	620	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»),	647
				(G4S)3,	412
				VH5-DMP VL,	363
				(G4S)4,	411
		VH5-DMP VH	244		
		hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5 monovalent, deamidated, S->P (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG),M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5_DM monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5_DM monovalent, (HC 1, -впадина)	621	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»),	647
				(G4S)3,	412
				VH5-DM VL,	362
				(G4S)4,	411
		VH5-DM VH	243		
		hu11F11(ver.2)(M428L)-VH5 monovalent, deamidated, S->P (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG),M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH6-DMP bivalen	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH-DMP6 бивалентная (HC)	622	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH6-DMP VL,	368
				(G4S)4,	411
				VH6-DMP VH	249
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH6-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH6-DM бивалентная (HC)	623	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH6-DM bivalent VL, (G4S)4,	367
				(G4S)4,	411
				VH6-DM VH	248
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH7-DMP bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH7-DMP бивалентная (HC)	624	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH7-DMP VL,	373
				(G4S)4,	411
				VH7-DMP VH	254

hu11F11(ver.2)(M428L)-VH7-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH7-DM bivalent, (HC)	625	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH7-DM VL,	372
				(G4S)4,	411
				VH7-DM VH	253
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DMP bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DMP бивалентная (HC)	626	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH9-DMP VL,	378
				(G4S)4,	411
				VH9-DMP VH	259
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DM bivalent, (HC)	627	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH9-DM VL,	377
				(G4S)4,	411
				VH9-DM VH	258
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9 -DMP monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9 - DMPmonovalent, (HC 1, -впадина)	628	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				VH9-DMP VL,	378
				(G4S)4,	411
		VH9-DMP VH	259		
		hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9 monovalent, deamidated, S->P (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG),M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DM monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9-DM моновалентная (HC 1, -впадина)	629	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»,	647
				(G4S)3,	412
				VH9-DM VL,	377
				(G4S)4,	411
		VH9-DM VH	258		
		hu11F11(ver.2)(M428L)-VH9 monovalent, deamidated, S->P (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG),M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L)	Hu11F11-VLv3	hu11F11(ver.2)(M428L)	630	hu11F11(ver.2	646

)-VH16-DMP bivalent	4c)-VH16-DMP bivalent, (HC)		(IGG), M428L МУТАЦИЯ,	
				(G4S)3,	412
				VH16-DMP VL,	383
				(G4S)4,	411
				VH16-DMP VH	264
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DM бивалентная (HC)	631	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH16-DM VL,	382
				(G4S)4,	411
				VH16-DM VH	263
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DMP monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DMP моновалентная (HC 1, -впадина)	632	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»),	647
				(G4S)3,	412
				VH16-DMP VL,	383
				(G4S)4,	411
				VH16-DMP VH	264
		hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16 monovalent, deamidated, S->P (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG),M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DM monovalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16-DM моновалентная (HC 1, -впадина)	633	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L, МУТАЦИЯ ТИПА «ВПАДИНА»),	647
				(G4S)3,	412
				VH16-DM VL,	382
				(G4S)4,	411
				VH16-DM VH	263
		hu11F11(ver.2)(M428L)-VH16 monovalent, deamidated, S->P (HC 2, -выступ)	589	hu11F11(ver.2 (IGG),M428L МУТАЦИЯ, МУТАЦИЯ ТИПА «ВЫСТУП»	589
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH27-DMP бивалентная (HC)	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH27-DMP бивалентная (HC)	634	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH27-DMP VL,	388
				(G4S)4,	411
				VH27-DMP VH	269
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH27-DM	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH27-DM	635	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L	646

бивалентная (HC)		бивалентная (HC)		МУТАЦИЯ,	
				(G4S)3,	412
				VH27-DM VL,	387
				(G4S)4,	411
				VH27-DM VH	268
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH32 -DMP bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH32 -DMP бивалентная (HC)	636	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH32-DMP VL,	393
				(G4S)4,	411
				VH32-DMP VH	274
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH32-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH32-DM bivalent(HC)	637	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH32-DM VL,	392
				(G4S)4,	411
				VH32-DM VH	273
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH35-DMP bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH35-DMP бивалентная (HC)	638	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH35-DMP VL,	398
				(G4S)4,	411
				VH35-DMP VH	279
hu11F11(ver.2)(M428L)-VH35-DM bivalent	Hu11F11-VLv3 4c	hu11F11(ver.2)(M428L)-VH35-DM bivalent(HC)	639	hu11F11(ver.2 (IGG), M428L МУТАЦИЯ,	646
				(G4S)3,	412
				VH35-DM VL,	397
				(G4S)4,	411
				VH35-DM VH	278

Эффект изобретения

Антитело, полученное в одном воплощении настоящего изобретения, специфично связывается с IGF1R с оптимизированной силой связывания, подходящей для транцитоза через эндотелий головного мозга, и может быть полезно для доставки терапевтических антител для применения при дегенеративных заболеваниях головного мозга и раке головного мозга, терапевтическая эффективность которых ограничена из-за низкой способности к проникновению через сосудистый барьер головного мозга.

В частности, моноклональное антитело, раскрытое в настоящем изобретении, не влияет на связывание лигандов, таких как IGF-1, IGF-2 и инсулин, и их гомологов с IGF1R и действует, не ингибируя передачу сигналов через IGF1R. Таким образом, его полезность связана с проникновением через гематоэнцефалические барьеры.

Антитела, раскрытые здесь, позволяют эффективно удалять агрегаты альфа-синуклеина или стимулировать их распад, ингибируют проникновение альфа-синуклеина в клетки и поэтому могут быть полезным образом использованы в лечении заболеваний, ассоциированных с накоплением агрегатов альфа-синуклеина.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 представлены результаты дот-блоттинга, демонстрирующие, что антитело против альфа-синуклеина, полученное в одном воплощении настоящего изобретения, специфично связывается с нативным альфа-синуклеином в агрегированной форме.

На Фиг. 2 представлены результаты ELISA-анализа аффинности антитела против альфа-синуклеина, полученного в одном воплощении настоящего изобретения.

На Фиг. 3а представлены результаты VIAcore-анализа специфичности и аффинности преимущественного связывания антитела против альфа-синуклеина, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, с агрегатами альфа-синуклеина. На Фиг. 3б представлена таблица, в которой показаны результаты, представленные на Фиг. 3а.

На Фиг. 4а представлены результаты Octet-анализа специфичности преимущественного связывания антитела против альфа-синуклеина, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, с агрегатами альфа-синуклеина. На Фиг. 4б представлена таблица, в которой показаны результаты, представленные на Фиг. 4а.

На Фиг. 5а и Фиг. 5б показаны результаты, согласно которым антитела против альфа-синуклеина 3A9 и 11F11 в одном воплощении настоящего изобретения могут специфично распознавать тельца Леви и нейриты Леви в ткани головного мозга человека, соответственно. Показано, что антитела по настоящему изобретению связываются с тельцами Леви (стрелки) и нейритами Леви (нитевидная форма в нижней левой части).

На Фиг. 6 представлено схематическое отображение результатов картирования эпитопов антител против альфа-синуклеина по одному воплощению настоящего

изобретения, где антитела по настоящему изобретению связываются, в основном, с С-концевой областью.

На Фиг. 7 представлены результаты ELISA-анализа аффинности химерного антитела против альфа-синуклеина и гуманизированного антитела 11F11, полученных в одном воплощении настоящего изобретения.

На Фиг. 8 представлены результаты BIAcore-анализа специфичности и аффинности преимущественного связывания химерного антитела против альфа-синуклеина и гуманизированного антитела 11F11, полученных в одном воплощении настоящего изобретения, с агрегатами α -syn.

На Фиг. 9a, Фиг. 9b и Фиг. 10 представлены результаты дот-блоттинга и результаты ELISA-анализа, демонстрирующие, что химерное антитело к альфа-синуклеину, полученное в одном воплощении настоящего изобретения, специфично связывается с альфа-синуклеином, в особенности с агрегатами альфа-синуклеина, но не с бета-синуклеином, гамма-синуклеином, амилоидом бета₁₋₄₂ или белком тау.

На Фиг. 11a-11b представлены данные по связыванию антитела против IGF1R, полученного в одном из воплощений настоящего изобретения, с белком IGF1R.

На Фиг. 12 представлены данные по связыванию антитела против IGF1R, полученного в одном из воплощений настоящего изобретения, с клеточными линиями, экспрессирующими IGF1R.

На Фиг. 13 представлены данные по результатам, связанным с интернализацией антитела против IGF1R, полученного в одном из воплощений настоящего изобретения, клеточными линиями, экспрессирующими IGF1R, и тем, что происходит с ним в этих клеточных линиях.

На Фиг. 14 представлены данные по результатам, демонстрирующим, что антитело против IGF1R, полученное в одном из воплощений настоящего изобретения, не влияет на передачу сигналов через IGF1R или инсулин.

На Фиг. 15a представлены данные по результатам, демонстрирующим, что антитело против IGF1R, полученное в одном из воплощений настоящего изобретения, не обладает ADCC.

На Фиг. 15b представлены данные по результатам, демонстрирующим, что многократное введение антитела против IGF1R, полученного в одном из воплощений настоящего изобретения, не влияет на уровень IGF1R в головном мозге.

На Фиг. 15с представлена микроскопическая картина, демонстрирующая, что антитело против IGF1R, полученное в одном из воплощений настоящего изобретения, связывается с эндотелиальной клеткой головного мозга без связывания с нормальным нейроном в головном мозге.

На Фиг. 16 представлены данные по результатам, демонстрирующим, что биспецифичное антитело, содержащее антитело против IGF1R и терапевтическое антитело, может проникать в ГЭБ-систему эффективнее, чем терапевтическое антитело.

На Фиг. 17 представлены данные по результатам, демонстрирующим, что антитело против IGF1R и биспецифичное антитело, содержащее антитело против IGF1R и терапевтическое антитело, имеют распределение в головном мозге и СМЖ больше, чем терапевтическое антитело само по себе, когда их однократно вводят крысе.

На Фиг. 18а представлены результаты, идентифицирующие остаток, подверженный дезамидированию, в антителе против IGF1R, полученном в одном из воплощений настоящего изобретения.

На Фиг. 18b представлены варианты, полученные посредством замены конкретных аминокислот для предотвращения дезамидирования.

На Фиг. 19 представлены результаты картирования эпитопов антитела против IGF1R.

На Фиг. 20а и Фиг. 20b представлены результаты ELISA-анализа по измерению аффинности биспецифичного антитела по одному воплощению настоящего изобретения в отношении каждого антигена.

На Фиг. 20с и Фиг. 20d представлены результаты ELISA-анализа по сравнению химерного антитела и гуманизированного антитела применительно к каждому антигену.

На Фиг. 20е представлены результаты оценки фагоцитарной активности микроглии применительно к биспецифичному антителу, полученному в одном воплощении настоящего изобретения.

На Фиг. 21а-21е представлены результаты оценки эффективности биспецифичного антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения, по сравнению с одиночным антителом в модели на мышах.

На Фиг. 22 представлен результат, демонстрирующий увеличенный период полувыведения и лучшее проникновение через ГЭБ в результате конструирования Fc биспецифичного антитела, полученного в одном воплощении настоящего изобретения.

ВАРИАНТ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**Пример 1: Получение мышинового антитела к альфа-синуклеину****1-1: Иммунизация и получение гибридомы**

Мономерный альфа-синуклеин, полноразмерный (140 остатков) или без 21 остатков на С-конце (119 остатков), помещали в термомиксер при 37°C, агрегировали с покачиванием при 1050 об/мин на протяжении 14 суток и обрабатывали ультразвуком. Фибриллы α -syn, 140 остатков и 119 остатков, 1 мг/мл, смешивали с адьювантом в отношении 1:1 (об./об.).

Аминокислотная последовательность альфа-синуклеина *Homo sapiens* (SEQ ID NO:559):

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEEKTKQGVAEAAAGKTKEGVLVYVGSKTKEGVVHGVAT
VAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQ
EGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPAA.

Затем 200 мкл полученной смеси вводили подкожно самкам мышей BALB/c в возрасте от 5 до 7 недель. Через 2 недели проводили еще одно подкожное введение 200 мкл полученной смеси для стимуляции выработки антител. Через одну неделю после второй инъекции проводили забор крови и титрование иммунизации методом ELISA с использованием введенного антигена. Затем проводили третью инъекцию с подкожным введением антигена самого по себе.

У иммунизированных мышей удаляли селезенку и получали из нее клетки селезенки. Полученные клетки селезенки суспендировали в среде Hybridoma-SFM (Thermo Fisher Scientific, США), дополненной 10% FBS. Для получения гибридомы клетки селезенки и клетки мышинной миеломы SP2/0-Ag14 смешивали в среде Hybridoma-SFM без сыворотки с последующим центрифугированием для удаления среды. Затем к полученному клеточному осадку добавляли ПЭГ и проводили инкубацию при 37°C на протяжении 1 минуты для индукции слияния клеток.

1-2: Клонирование отдельных клеток и очистка антител

Через 2 недели после индукции слияния, слияние с мышинными В-клетками, продуцирующими антитела, подтверждали методом ELISA с использованием антигена, вводимого мышам, и среды для культивирования клеток. Затем проводили клонирование отдельных клеток с использованием гибридомы, отбирая 16 гибридом, продуцирующих моноклональные антитела. Клоны 9B11 (IgG1 каппа) были получены с использованием агрегатов полноразмерного (140 остатков) α -Syn в качестве антигена, а

клоны 3A9 и 11F11 (IgG2b каппа и IgG2b каппа, соответственно) были получены с использованием агрегатов α -Syn без 21 остатков на С-конце в качестве антигенов.

Для очистки антител каждую гибридому культивировали в среде RPMI1640, содержащей 10% FBS. Для получения антител культуральную среду заменяли бессывороточной средой SFM и проводили культивирование на протяжении приблизительно 4 суток. Супернатант клеточной культуры отделяли, центрифугировали, фильтровали через 0,22 мкм фильтр и очищали с использованием колонки с белком G для типа IgG1 и колонки с белком A для остальных антител.

1-3: Определение последовательности варибельной области

Последовательности варибельных областей и CDR определяли по Ahn et of al, Mol. Cells 2004, 18 (2): 237-241. Гибридомы культивировали и центрифугировали, выделяя только клетки. Из выделенных гибридом выделяли РНК, добавляя триазол, и использовали ее в качестве матрицы для синтеза кДНК. Последовательности варибельных областей и CDR подтверждали секвенированием.

Пример 2. Получение (химерных) антител против альфа-синуклеина

2-1: Клонирование и экспрессия антител

Используя нуклеотидные последовательности варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи антитела, полученного после гуманизации, синтезировали gBlock (M.Biotech) короткого нуклеотидного фрагмента и клонировали его в вектор для культур клеток животных (pcDNA3.4). gBlock синтезировали, включая перекрывающиеся последовательности длиной приблизительно 20 п.о. до и после варибельной области, и часть вектора pcDNA3.4 без варибельной области амплифицировали посредством ПЦР и клонировали методом сборки по Гибсону.

Для трансфекции и экспрессии клонированного антитела полученный вектор использовали для Maxi-Prep (Qiagen) с получением большого количества плазмидной ДНК и затем вводили ее в клетки следующим образом. В день, предшествующий трансфекции, концентрацию клеток ExpiCHO™ (Gibco, номер по каталогу A29127) доводили до $3-4 \times 10^6$ жизнеспособных клеток на мл в экспрессионной среде ExpiCHO™ (Gibco, номер по каталогу A29100-01) и проводили культивирование при 8% CO₂, 37°C и 120 об/мин на протяжении 1 суток. В день трансфекции ДНК проводили подготовку клеток, выращенных до $7-10 \times 10^6$ жизнеспособных клеток на мл, с показателями выживаемости 95% или более, разводя их свежей средой до 6×10^6 жизнеспособных клеток на мл.

Для трансфекции исходных клеток подготавливали комплекс ExpiFectamine™ CHO и плазмидной ДНК с использованием набора для трансфекции ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit (Gibco, номер по каталогу A29129). ДНК и реагенты ExpiFectamine™ CHO подготавливали в подходящих концентрациях, разводя их холодной средой OptiPRO™ SFM® (Gibco, номер по каталогу 12309019), вносили соответствующим образом и перемешивали, оставляя стоять при комнатной температуре на 5 минут. Полученный продукт добавляли к исходным клеткам и проводили их посттрансфекционное культивирование. На следующий день после трансфекции к трансфицируемым клеткам добавляли реагенты Enhancer и Feed, входящие в состав набора ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit, и через 5 суток еще раз добавляли реагент Feed, после чего проводили инкубацию на протяжении 10 суток при 8% CO₂, 37°C и 120 об/мин с получением трансфицированных клеток.

Для получения культурального раствора культуральную среду переносили в центрифужную бутылку для центрифугирования и центрифугировали при 4°C и 6500 об/мин на протяжении 30 минут с последующей фильтрацией через фильтр размером 0,2 мкм, получая культуральную среду без взвешенных твердых частиц, и затем полученную культуральную среду использовали для последующей очистки.

2-2: Очистка и секвенирование антитела

Культуру очищали с использованием HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare, 11-0034-94). После уравнивания уравнивающим буфером (50 мМ трис-НСl, рН 7,2, 100 мМ NaCl) полученную культуру загружали на колонку. По завершении загрузки среду промывали 50 мМ цитратом натрия (рН 5,0) и затем проводили элюирование с использованием 50 мМ цитрата натрия (рН 3,4). К элюату добавляли 1 М трис-НСl, рН 9,0, для нейтрализации до рН 6,0. Затем в элюате заменяли буфер, концентрировали его с использованием PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор, рН 7,4) и хранили при 4°C до последующего использования.

При необходимости дополнительной очистки проводили вторую очистку, исходя из размера элюированного образца, пропуская первый очищенный продукт через 1X PBS-буфер на колонке HiLoad 26/600 Superdex 200. Аминокислотную последовательность очищенного антитела анализировали масс-спектрометрией и подтверждали ее соответствие варибельной области моноклонального антитела мышинового происхождения.

Остов варибельной области человеческого антитела изотипа IgG1 заменяли варибельными областями антител 3A9, 9B11 и 11F11, определенными описанным выше методом, с получением химерного человеческого антитела IgG1. Среди полученных химерных антител, в частности, антитело Ch11F11 представляет собой антитело в форме IgG и содержит комбинацию последовательности варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO:90 (ch11F11-VH) и последовательности варибельной области легкой цепи SEQ ID NO:109 (ch11F11-VL), и антитело Ch3A9 представляет собой антитело в форме IgG и содержит комбинацию последовательности варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO:102 (ch11F11-VH) и последовательности варибельной области легкой цепи SEQ ID NO:116 (ch11F11-VL).

Пример 3: Получение гуманизированного антитела

3-1: Получение фаговой библиотеки

Конструировали минибблиотеку, в которой последовательность мышиноного или человеческого происхождения была введена в каждый остаток CDR, при связывании человеческих каркасных областей с остатками CDR1, CDR2 и CDR3 химерного антитела.

Компетентные клетки полученной минибiblioteки вносили в 2X среду YT (17 г триптона (CONDA, 1612.00), 10 г дрожжевого экстракта (CONDA, 1702.00) и 5 г NaCl (Sigma, S7653)), содержащую 34 мкг/мл хлорамфеникола (Sigma, C0857), 2% глюкозы (Sigma, G5400) и 5 мМ MgCl₂ (Sigma, C0857), при 30°C на 3 часа до OD₆₀₀ 0,5-0,7. Затем клетки инфицировали фагом-помощником и культивировали в 2X среде YT, содержащей 34 мкг/мл хлорамфеникола, 5 мМ MgCl₂, 70 мкг/мл канамицина (Sigma, K1876) и 1 мМ IPTG (ELPISBIO, IPTG025), при 30°C на протяжении 6 часов для индукции упаковки фагов. Культуральный раствор центрифугировали при 4500 об/мин и 4°C на протяжении 15 минут. В супернатант добавляли 4% ПЭГ 6000 (Fluka, 81253) и 3% NaCl (Sigma, S7653) и проводили инкубацию на протяжении 1 часа на льду. Полученный продукт центрифугировали при 8000 об/мин на протяжении 20 минут при 4°C, затем осадок суспендировали в PBS и центрифугировали снова при 4°C и 12000 об/мин на протяжении 10 минут с получением супернатанта, содержащего фаговую библиотеку. Полученный супернатант хранили при 4°C до последующего использования.

3-2: Пэннинг с фаговым дисплеем

Для отбора антител, связывающихся преимущественно с агрегатами альфа-синуклеина, а не с его мономерами, проводили пэннинг с использованием агрегатов полноразмерного альфа-синуклеина, полученных в Примере 1, и в общей сложности три пэннинга проводили следующим образом.

Бычий сывороточный альбумин (BSA) добавляли к клеткам в концентрации 3% в пробирке при 4°C на ночь, вносили в нее 10 мкг/мл агрегатов и мономеров рекомбинантного альфа-синуклеина в растворе PBS в иммунологической пробирке (Maxisorp 444202) и защищали поверхности, на которые не были сорбированы агрегаты и мономеры альфа-синуклеина. После опорожнения пробирки фаговую библиотеку антител, разведенных в 3%-м растворе BSA до 10^{12} КОЕ, помещали в иммунологическую пробирку, на которую были сорбированы агрегаты и мономеры альфа-синуклеина, и проводили взаимодействие на протяжении 1 часа (отрицательный отбор). Затем фаги, не связанные с агрегатами и мономерами альфа-синуклеина, выделяли и подвергали взаимодействию на протяжении 2 часов при комнатной температуре с сорбированными агрегатами и мономерами альфа-синуклеина. Забуференный фосфатом физиологический раствор (0,05% Tween 20) использовали для восстановления 100 мкМ раствора триэтиламина, который восстанавливали с использованием раствора PBS-T. *E. coli* при 37°C на протяжении 1 часа, и инфицированные *E. coli* высевали на 2X агаровую среду YT и культивировали при 37°C в течение ночи (pH 7,4), их инфицировали ER2537. На следующий день культивированные *E. coli* суспендировали в 4 мл 2X культурального раствора YT, содержавшего карбенициллин, добавляли 15% глицерин и часть хранили при -80°C, а остальное использовали для получения фагов для последующих экспериментов. Повторяя этот процесс на протяжении в общей сложности 3 раундов, амплифицировали и концентрировали пул фагов, специфичных в отношении антигена альфа-синуклеина. Во время более поздних раундов пэннинга число промывок с использованием PBS-T увеличивали для увеличения количества и концентрации антигенспецифичных фагов.

3-3: Скрининг отдельных клонов

Для отбора моноклональных антител, специфично связывающихся с агрегатами альфа-синуклеина из пула фагов, полученного при пэннинге, проводили следующий эксперимент.

Для выделения моноклонов из концентрированного пула, после высева пула фагов на агаровую среду LB с тетрациклином/карбенициллином и культивирования, выделяли отдельные колонии. Затем, после внесения моноклонов в глубокий 96-луночный планшет, в каждую лунку которого вносили по 400 мкл 2X среды YT с тетрациклином/карбенициллином, и выращивания в течение ночи, по 10 мкл культурального раствора вносили в новый глубокий 96-луночный планшет, в который вносили по 390 мкл 2X среды YT с тетрациклином/карбенициллином, и культивировали при 37°C на протяжении 4 часов. В культуральный раствор вносили 1 мМ IPTG и культивировали его при 30°C в течение ночи. Культуральный раствор, культивированный в течение ночи, центрифугировали, отбирая супернатант.

Затем клоны, экспрессирующие моноклональные растворимые scFv, связывающиеся с агрегатами альфа-синуклеина, отбирали с применением метода ELISA, как описано ниже (Steinberger, Rader and Barbas III. 2000. Phage display vectors. In: Phage Display Laboratory Manual. 1sted. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY. USA. pp.11.9-11.12). Конкретно, антитело 7B7, отобранное в Примере 1-1, вносили в 96-луночный планшет (*Nunc-Immuno Plates, NUNC, США*) и проводили сорбцию при 4°C в течение ночи. В каждую лунку вносили 3% BSA в количестве 200 мкл с последующей блокировкой при 37°C на протяжении 2 часов. Затем вносили агрегаты и мономеры альфа-синуклеина в концентрации 100 нг на лунку, проводили взаимодействие при 37°C на протяжении 2 часов и пятикратную промывку с использованием 300 мкл PBS-T. Полученный супернатант отдельного клона смешивали с 3% BSA в объемном отношении 1:1 (об./об.) и 100 мкл полученного раствора вносили в планшет, с которым были связаны агрегаты и мономеры, с последующим взаимодействием при 37°C на протяжении 2 часов. Клетки промывали пять раз с использованием 300 мкл PBS-T и инкубировали при 37°C на протяжении 1 часа с антителом против HA, конъюгированным с HRP, с последующей пятикратной промывкой PBS-T. После добавления 100 мкл ТМВ (тетраметилбензидин, Sigma, T0440), реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 Н H₂SO₄ для измерения оптической плотности при 450 нм. Клоны с оптической плотностью 0,5 или более рассматривали как положительную реакцию связывания, а клоны, неспецифично связывавшиеся с BSA, исключали.

Остатки CDR клонов, обнаруженных в библиотеке, анализировали на компьютере параллельно и отбирали клоны, приводившие к серьезным проблемам со

связыванием с каркасными областями, или клоны, не имевшие Т-клеточного эпитопа, В-клеточного эпитопа и эпитопа МНСII в каркасных областях, отличных от CDR.

Затем для пяти антител, полученных с использованием следующих комбинаций переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, переменную область гуманизированного антитела человеческого изотипа IgG1 заменяли на остов переменной области с получением пяти гуманизированных антител с остовом IgG1. Конкретно, Hu11F11 (ABL2-4) представляет собой антитело типа IgG и содержит комбинацию последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO:92 (Hu11F11-VH2) и последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO:113 (Hu11F11-VL4). Hu11F11 (ver.1) представляет собой антитело типа IgG и содержит комбинацию последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO:98 (Hu11F11-VH-v1) и последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO:115 (Hu11F11-VLv3 4c). Hu11F11 (ver.2) представляет собой антитело типа IgG и содержит комбинацию последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO:99 (Hu11F11-VH-v2) и переменной области легкой цепи SEQ ID NO:115 (Hu11F11-VLv3 4c). Hu11F11 (ver.3) представляет собой антитело типа IgG и содержит последовательность переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO:100 (Hu11F11-VH-v3) и последовательность переменной области легкой цепи SEQ ID NO:115 (Hu11F11-VLv3 4c).

Hu11F11 (ver.4) представляет собой комбинацию последовательности переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO:101 (Hu11F11-VH-v4) и последовательности переменной области легкой цепи SEQ ID NO:115 (Hu11F11-VLv3 4c).

Пример 4. Анализ специфичности и аффинности связывания с антигеном при использовании антитела к альфа-синуклеину

4-1: Дот-блоттинг-анализ с использованием антитела против альфа-синуклеина

Эксперименты с дот-блоттингом проводили для анализа возможного связывания антитела по настоящему изобретению с мономерами или агрегатами в нативном состоянии. Для эксперимента 50 нг или 100 нг мономерного или фибриллярного белка α -syn (полученного профессором Lee Seung-jae из Национального университета Сеула (Seoul National University); *Bae et al., J. Neurosci* 32: 13454, 2012) наносили пятнами на нитроцеллюлозную мембрану. Двукратные разведения мономерного или фибриллярного белка наносили последовательно от правого края мембраны к левому

(12,5, 25, 50, 100 нг). Мембрану блокировали 5% нежирным сухим молоком с TBST на протяжении 1 часа при комнатной температуре. 1 мг/мл антитела к α -syn, полученного в Примере 1, добавляли к TBST, содержащему 1% бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали при комнатной температуре на протяжении 1 часа. После промывки с использованием TBST сигналы анализировали с использованием хемилюминесцентного субстрата (NEN) в качестве субстрата и вторичного антитела, конъюгированного с HRP (пероксидаза хрена), следуя инструкциям изготовителя. Результаты визуализировали с использованием системы анализа люминесцентных изображений LAS-3000 Luminescent Image Analysis System (FUJIFILM Life Science). Результаты показаны на ФИГ. 1.

Как показано на Фиг. 1, было обнаружено, что антитело к альфа-синуклеину по настоящему изобретению связывается преимущественно с агрегатами, но не с мономерами альфа-синуклеина. В частности, 9B11, 3A9 и 11F11 связывались с агрегатами. Антитело 274 (Bae et al., J Neurosci. 2012 Sep 26; 32 (39): 13454-13469) использовали в качестве антитела сравнения, связывающегося как с мономерами, так и с агрегатами.

4-2: ELISA-анализ с использованием мышинового моноклонального антитела против α -Syn

ELISA-анализ проводили для количественного анализа аффинности связывания антитела по настоящему изобретению с антигеном. Для этого антитело к альфа-синуклеину, полученное в Примере 1, сорбировали на 96-луночный планшет в концентрации 1 мкг/мл и обрабатывали агрегатами фибрилл альфа-синуклеина в концентрации 10, 100, 1000 и 10000 нг/мл. После промывки с использованием PBS вносили стрептавидин, конъюгированный с HRP, и конъюгат вторичного антитела с биотином и затем проводили взаимодействие с ТМВ в качестве субстрата. Измеряли оптическую плотность, и полученные результаты показаны на ФИГ. 2.

Как показано на Фиг. 2, было обнаружено, что антитела по настоящему изобретению связываются преимущественно с агрегатами с высокой аффинностью связывания. Результаты ELISA показали, что антитела, связывающиеся преимущественно с агрегатами, имеют аффинность от $0,1 \times 10^{-9}$ М до 2×10^{-9} М, в то время как аффинность антител, связывавшихся как с мономерами, так и с агрегатами, была выше и составляла приблизительно 1×10^{-10} М. Антитело по настоящему изобретению связывалось преимущественно с агрегатами альфа-синуклеина с высокой

аффинностью, но получить аффинность в отношении мономера не удалось, поскольку оно связывалось с мономером с меньшей аффинностью, чем с агрегатами, или не связывалось с мономером. Эти результаты показывают, что рассматриваемое антитело позволяет эффективно устранять или ингибировать действие агента, вызывающего нейродегенеративные заболевания, связанные с альфа-синуклеиновой этиологией, такие как болезнь Паркинсона.

4-3. ВІАcore-анализ с использованием антитела против альфа-синуклеина

Проводили количественный анализ связывания антитела к альфа-синуклеину, полученного в Примере 1, с мономерными и агрегированными антигенами с применением ВІАcore-анализа.

Используемый прибор представлял собой T200 (GE Healthcare, серийный номер 1565888). В качестве чипа использовали белок А (GE Healthcare, номер по каталогу 29-1275-56). 10 мМ глицин-НСl, рН 1,5 (GE Healthcare, номер по каталогу BR-1003-54), был восстанавливающим буфером. Рабочим буфером, буфером для разведения аналитов и буфером для разведения образцов был HBS-EP. Антитела к α -syn (3A9, 9B11 и 11F11), полученные в Примере 1, разводили в 1x HBS-EP (GE Healthcare, номер по каталогу BR-1006-69), альфа-синуклеин в форме мономерного (1 мг/мл) и фибриллярного (3 мг/мл) белка разводили серийно в двух повторах и анализировали в общей сложности 6 концентраций (0, 0,39, 1,56, 6,25, 25, 100 нМ), включая 0 нМ. Для захвата число RU мономера составляло 800 (теоретическое), а число RU фибрилл — 100 (теоретическое). Фазу захвата проводили при времени контакта 60 секунд, скорости потока 30 мкл/мин и периоде стабилизации 180 секунд. Фазу ассоциации проводили при времени ассоциации 120 секунд, и скорость потока составляла 30 мкл/мин. Фазу диссоциации проводили при времени диссоциации 360 секунд и скорости потока 30 мкл/мин. Фазу регенерации проводили дважды при времени регенерации 240 секунд (первичная) и 60 секунд (вторичная) и скорости потока 30 мкл/мин. Приближение проводили с использованием модели связывания 1:1, и аналитическим программным обеспечением было программное обеспечение ВІАCore T200 Evaluation Software (GE Healthcare). Полученные результаты показаны на Фиг. 3а и 3б.

На Фиг. 3а представлены результаты ВІАcore-анализа специфичности и аффинности преимущественного связывания моноклонального антитела, полученного в одном примере настоящего изобретения, с агрегатами альфа-синуклеина. Показано, что

антитело по настоящему изобретению связывается с агрегатами с высокой аффинностью. Эти результаты показывают, что рассматриваемое антитело позволяет эффективно устранять или ингибировать действие агента, вызывающего нейродегенеративные заболевания, связанные с альфа-синуклеиновой этиологией, такие как болезнь Паркинсона. На Фиг. 3b представлена таблица, в которой показаны результаты, представленные на Фиг. 3a.

Как показано на Фиг. 3a и Фиг. 3b, 3A9, 9B11 и 11F11, у которых среди четырех антител к альфа-синуклеину, проанализированных другими методами, описанными выше, было подтверждено преимущественное связывание с агрегатами, в ВІАсоге-анализе связывались только с агрегатами с высокой аффинностью, составлявшей приблизительно от 1×10^{-9} М до 3×10^{-9} М.

4-4. Octet-анализ с использованием мышинового моноклонального антитела против α -Syn

Проводили количественный анализ связывания антител к альфа-синуклеину (3A9, 9B11, 11F11), полученных в Примере 1, с мономерными и агрегированными антигенами с применением Octet.

Конкретно, рабочий буфер представлял собой 1x буфер КВ (номер по каталогу 18-1092) или 1x буфер PBS при 1000 об/мин, а буфер для иммобилизации представлял собой ацетат натрия, рН 5 (10 мМ, номер по каталогу 18-1068). Мономеры α -syn иммобилизовали как антиген α -syn, а фибриллы иммобилизовали для анализируемых антител. Целевые концентрации составляли 20 мкг/мл для мономера и 0,4 мкг/мл для фибрилл. Для оценки кинетики концентрации последовательно снижали в два раза, начиная с 50 нМ для мономеров и 100 нМ для фибрилл, получая в общей сложности 7 точек, соответственно. Время ассоциации/диссоциации составляло 5 мин/20 мин для мономера и 5 мин/25 мин для фибрилл. Биосенсор представлял собой ARG2, и приближение проводили с применением модели приближения 1:1. Полученные результаты показаны на ФИГ. 4. На Фиг. 4a представлены результаты Octet-анализа специфичности преимущественного связывания антитела к альфа-синуклеину по одному воплощению настоящего изобретения с агрегатами α -Syn.

Как показано на Фиг. 4a, 3A9, 9B11 и 11F11 продемонстрировали незначительное связывание с мономерами (рамка с красными точками), но хорошо связывались с агрегатами (возрастающая часть графика в рамке с красными точками). Эти результаты сходны или согласуются с результатами дот-блоттинга, Octet-анализа и

ELISA-анализа, и показывают, что 3A9, 9B11 и 11F11, у которых среди четырех антител к альфа-синуклеину, проанализированных другими методами, описанными выше, было подтверждено преимущественное связывание с агрегатами, в Octet-анализе связывались только с агрегатами. На Фиг. 4b представлена таблица, в которой показаны результаты, представленные на Фиг. 4a. Результаты, представленные на ФИГ. 4a и ФИГ. 4b, демонстрируют преимущественное связывание с агрегатами альфа-синуклеина и согласуются с результатами, представленными на ФИГ. 1. Антитело #274, использованное в качестве контрольной группы, хорошо связывалось как с мономерами, так и с агрегатами.

Пример 5. Выявление телец Леви в ткани головного мозга человека антителом против альфа-синуклеина

Тельца Леви и нейриты Леви в заключенных в парафин срезах головного мозга толщиной десять микрометров, полученных от пациентов, умерших от болезни Паркинсона (Dr. Halliday, Сиднейский университет (University of Sydney)), окрашивали с использованием антитела, использованного в Примере 5, следующим образом. Срезы ткани обрабатывали 90% муравьиной кислотой на протяжении 3 минут для демаскировки антигенов и затем пероксидазную активность самой ткани ингибировали 1% H_2O_2 (на основе 50% этанола). Проводили обработку 10% нормальной лошадиной сывороткой для предотвращения неспецифического связывания с тканями. Затем, после промывки фосфатным буфером, соседние срезы обрабатывали антителами 3A9, 11F11 и 11F11 по настоящему изобретению при 4°C в течение ночи. После промывки фосфатным буфером проводили обработку антителом против человеческого IgG, конъюгированным с биотином, при 37°C на протяжении 30 минут и взаимодействие с образованием авидин-биотинового комплекса при комнатной температуре на протяжении 30 минут (набор Vectastatin Elite; Vector Laboratories).

Затем проводили окрашивание с использованием DAB, содержавшего 0,005% H_2O_2 , и контрастирующее окрашивание срезов 0,5% крезил-виолетом для различения каждой клетки. Полученные результаты показаны на Фиг. 5a и 5b.

На Фиг. 8a и Фиг. 8b показаны результаты, согласно которым моноклональные антитела 3A9 и 11F11 согласно одному воплощению настоящего изобретения могут специфично распознавать тельца Леви и нейриты Леви в ткани головного мозга человека, соответственно. Они показывают, что антитела по настоящему изобретению

связываются с тельцами Леви (стрелки) и нейритами Леви (нитевидная форма в нижней левой части).

Как показано на Фиг. 8a и Фиг. 8b, антитело по настоящему изобретению продемонстрировало эффективное связывание с тельцами Леви и нейритами Леви (показано стрелками). Эти результаты показывают, что оно способно эффективно связываться с агрегатами альфа-синуклеина, входящими в состав телец Леви, в ткани головного мозга человека. Показано, что антитела, доставленные в головной мозг человека, могут эффективно и специфично связываться с агрегатами альфа-синуклеина. Эти результаты указывают на то, что антитела по настоящему изобретению фактически могут специфично связываться с агрегатами альфа-синуклеина в ткани головного мозга человека и могут быть эффективно использованы для предотвращения и/или лечения заболеваний, связанных с альфа-синуклеиновой этиологией.

Пример 6. Анализ эпитопов антитела против альфа-синуклеина

Картирование эпитопов антител 3A9 и 11F11 как химерных антител, полученных в Примере 2, проводили, запрашивая пептидный аллельный анализ у PEPSKAN (Нидерланды). Полученные результаты показаны на Фиг. 6. На Фиг. 6 представлено схематическое отображение результатов картирования эпитопов антител согласно одному воплощению настоящего изобретения.

Как показано на Фиг. 6, было продемонстрировано, что большинство антител по настоящему изобретению связываются с С-концевой областью. Антитела к альфа-синуклеину, распознающие N-конец, не могли распознавать агрегаты при других заболеваниях, таких как мультисистемная атрофия, принадлежащих к синуклеинопатиям, которые, вместе взятые, называют заболеваниями, связанными с альфа-синуклеином. В отличие от этого, антитела к альфа-синуклеину, распознающие С-концевую область, обладают тем преимуществом, что они распознают агрегаты при различных других синуклеинопатиях так же, как при болезни Паркинсона. В частности, как описано выше, было показано, что антитела, распознающие область между остатками 110 и 122, связываются преимущественно с агрегатами.

Пример 7. ELISA-анализ с использованием антитела против альфа-синуклеина

Для количественного анализа аффинности связывания химерных антител (Ch11F11), полученных в Примере 2, и гуманизированных антител (Hu11F11), полученных в Примере 3, проводили сэндвич-ELISA, применяя почти такой же метод, как в Примере 4-2.

Конкретно, каждое антитело разводили в отношении 1/10, получая концентрации от 0,04 до 400 нМ, и сорбировали на 96-луночный планшет, после чего в каждую лунку вносили агрегаты фибрилл синуклеина в концентрации 2000 нг/мл. После промывки с использованием 1X PBS вносили стрептавидин, конъюгированный с HRP, и конъюгат вторичного антитела с биотином и затем проводили взаимодействие с ТМВ в качестве субстрата. Измеряли оптическую плотность. Полученные результаты показаны на ФИГ. 7.

Как показано на ФИГ. 7, было подтверждено, что гуманизированные антитела по настоящему изобретению, в частности гуманизированные антитела, имеющие происхождение от химерного 11F11 (гуманизированные антитела 11F11), демонстрируют аффинность связывания, эквивалентную химерному клону 11F11. Было подтверждено, что гуманизированные антитела, особенно гуманизированные антитела, имеющие происхождение от химерного 11F11, такие как hu11F11 (ver.1), содержащее комбинацию Hu11F11-VH-v1 и Hu11F11-VLv3 4c, hu11F11 (ver.2), содержащее комбинацию Hu11F11-VH-v2 и Hu11F11-VLv3 4c, hu11F11 (ver.3) содержащее комбинацию Hu11F11-VH-v3 и Hu11F11-VLv3 4c, hu11F11 (ver.4), содержащее комбинацию Hu11F11-VH-v4 и Hu11F11-VLv3 4c, демонстрировали аффинность связывания, эквивалентную химерному 11F11, а их EC₅₀ составляла от 11,5 до 15,1 нМ, что сходно с EC₅₀ химерного антитела 11F11, составлявшей 12,5 нМ.

Пример 8: ВИАсоге-анализ с использованием антитела против альфа-синуклеина

Для количественного анализа аффинности связывания химерных антител (Ch11F11), полученных в Примере 2, и гуманизированных антител (Hu11F11), полученных в Примере 3, проводили ВИАсоге-анализ, применяя почти такой же метод, как в Примере 4-3. Результаты анализа показаны на Фиг. 8 и в следующей таблице.

[Таблица 18]

Название клона	K _D (нМ)
Ch11F11	0,02472
Hu11F11(ver.2)	0,0596
Hu11F11(ver.3)	0,0316
Hu11F11(ver.4)	0,0204

В результате, гуманизированные антитела по настоящему изобретению, особенно варианты клона 11F11, а именно hu11F11 (ver.2) (комбинация Hu11F11-VH-v2 и Hu11F11-VLv3 4c), hu11F11 (ver.3) (комбинация Hu11F11-VH-v3 и

Hu11F11-VLv3 4c) или hu11F11 (ver.4) (комбинация Hu11F11-VH-v4 и Hu11F11-VLv3 4c), продемонстрировали значения K_D , сходные со значениями K_D химерного клона 11F11. Применительно к аффинности связывания, гуманизированные клоны продемонстрировали K_D 0,02-0,06 x 10⁻⁹ М, а химерный клон 11F11 продемонстрировал K_D 0,02 x 10⁻⁹ М. То есть, гуманизированные клоны продемонстрировали высокую аффинность связывания с агрегатами.

Пример 9. Оценка специфичного связывания химерного антитела с альфа-синуклеином

9-1: ELISA-анализ с бета-синуклеином и гамма-синуклеином

После получения трех химерных антител 3A9, 9B11 и 11F11 по Примеру 2 проводили сравнение специфичности связывания этих антител с альфа-синуклеином по результатам ELISA-анализа с бета-синуклеином и гамма-синуклеином, которые являются гомологами альфа-синуклеина.

Для проведения оценки каждый белок из человеческого бета-синуклеина (UniProt: Q16143) (CUSABIO, номер по каталогу CSB-EP624090HU) и человеческого гамма-синуклеина (UniProt: O76070) (CUSABIO, номер по каталогу CSB-EP021915HU) сорбировали на 96-луночный планшет в концентрации 100 нг/мл, проводили промывку и последующую блокировку 5% BSA на протяжении 2 часов. В данном случае в качестве положительного контроля использовали антитело ко всем типам синуклеина (pan-Syn) (Santa Cruz, номер по каталогу FL-140, sc-10717, кроличье), связывающееся с альфа-синуклеином, бета-синуклеином и гамма-синуклеином. После промывки химерные антитела (3A9, 9B11, 11F11) разводили 1/10 до концентраций от 400 нМ до 0,04 нМ и вносили на 2 часа, проводили промывку с использованием PBS и затем вносили козы антитела против hFc, связанные с HRP, в качестве антител для выявления. Затем измеряли оптическую плотность при 450 нм и 650 нм после взаимодействия с ТМВ в качестве субстрата. Для положительного контроля в качестве антитела для выявления использовали козье противокроличье антитело, связанное с HRP.

Результаты эксперимента показаны на Фиг. 9а и Фиг. 9б, где представлены результаты ELISA-анализа, демонстрирующие, что химерные антитела (3A9, 9B11, 11F11) имеют очень низкую аффинность связывания с человеческим бета-синуклеином и человеческим гамма-синуклеином. В отличие от них, антитело pan-Syn, использованное в качестве положительного контроля, продемонстрировало высокую

аффинность связывания с бета-синуклеином и гамма-синуклеином. Фиг. 9a относится к человеческому бета-синуклеину, а Фиг. 9b относится к человеческому гамма-синуклеину.

9-2: Дот-блоттинг-анализ с агрегатами бета-амилоида и белка тау

Три типа химерных антител 3A9, 9B11 и 11F11, полученных в Примере 2, подвергали взаимодействию с агрегатами амилоида бета₁₋₄₂ (Uniprot: P05067; CAS-номер: 107761-42-2) и белка тау (Uniprot: P10636-8). Способность антител к специфичному связыванию с агрегатами альфа-синуклеина анализировали блоттингом по следующей причине.

Амилоид бета₁₋₄₂ и белок тау образуют агрегаты, которые, как полагают, являются важными этиологическими факторами нейродегенеративных заболеваний, особенно болезни Альцгеймера, и эти агрегаты имеют олигомеры, протофибриллы и фибриллы, аналогично агрегатам альфа-синуклеина. Таким образом, дот-блоттинг позволил подтвердить, что химерные антитела 3A9, 9B11 и 11F11 распознают специфическую последовательность альфа-синуклеина и не распознают общую структуру агрегатов, имеющих происхождение от альфа-синуклеина, амилоида бета и белка тау.

В данном примере метод дот-блоттинга применяли почти таким же образом, как в Примере 4-3, и рекомбинантный амилоид бета₁₋₄₂, белок тау и их агрегаты были получены профессором Seung-jae Lee из Национального университета Сеула (Seoul National University). Syn-1, 6E10 и Tau5 представляют собой известные антитела, связывающиеся с альфа-синуклеином, амилоидом бета₁₋₄₂ и белком тау, соответственно. Результаты анализа показаны на ФИГ. 10.

Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 10 и демонстрируют, что химерные антитела 3A9, 9B11 и 11F11 по настоящему изобретению специфично связываются только с агрегатами, имеющими происхождение от альфа-синуклеина, но не с агрегатами, имеющими происхождение от амилоида бета₁₋₄₂ и белка тау. В отличие от них, антитела 6E10 и Tau5, которые, как известно, связываются с амилоидом бета₁₋₄₂ и белком тау, соответственно, продемонстрировали связывание с соответствующими агрегатами при дот-блоттинге.

Согласно описанным выше результатам, химерные антитела не связываются с гомологами альфа-синуклеина и агрегатами, имеющими происхождение от других белков, но эффективно связываются только с белком-мишенью. Это позволяет

предполагать, что они могут быть эффективнее антител или лекарственных средств, связывающихся с гомологами и агрегатами, имеющими происхождение от других белков.

Пример 10. Получение биспецифичных антител

10-1: Клонирование бивалентного биспецифичного антитела

Для конструирования вектора экспрессии бивалентного биспецифичного антитела нуклеотидную последовательность антитела, содержащую сигнальную последовательность, вводили в множественный сайт клонирования (MCS) вектора pсDNA3.4 (Invitrogen). Вектор экспрессии биспецифичного антитела представлял собой моноцистронный вектор, и, соответственно, были получены вектор экспрессии тяжелой цепи и вектор экспрессии легкой цепи.

В качестве последовательности тяжелой цепи, вводимой в вектор экспрессии тяжелой цепи, scFv против IGF1R был связан через линкер с С-концом иммуноглобулина, где были связаны переменная область тяжелой цепи, кодирующая антитело против альфа-синуклеина, и человеческая константная область тяжелой цепи. В качестве последовательности легкой цепи, вводимой в вектор экспрессии легкой цепи, были связаны переменная область легкой цепи, кодирующая антитело против альфа-синуклеина, и человеческая константная область легкой цепи.

10-2: Клонирование моновалентного биспецифичного антитела

Моновалентное биспецифичное антитело представляло собой гетеродимер, содержащий тяжелую цепь («впадина») иммуноглобулина против альфа-синуклеина, с С-концом которой был связан scFv против IGF1R, и тяжелую цепь («выступ») иммуноглобулина против альфа-синуклеина без связанного scFv, и легкую цепь, конъюгированную с указанным гетеродимером.

Для повышения эффективности конъюгации гетеродимера тяжелых цепей применяли методику «выступ во впадину» (Knob-in-Hole). То есть, в СНЗ-части кодирующей последовательности тяжелой цепи типа «впадина» проводили замены T366S, L368A и Y406V, а в СНЗ-части кодирующей последовательности тяжелой цепи типа «выступ» проводили аминокислотную замену T366W.

10-3: Транзиторная трансфекция

Полученный вектор использовали в Maxi-Prep (Qiagen) с получением большого количества плазмидной ДНК. Затем ее вводили в клетки следующим образом. Для получения моновалентного BsAb, ДНК вектора экспрессии тяжелой цепи и ДНК

вектора экспрессии легкой цепи использовали для трансфекции в отношении 1:1. Для получения моновалентного VsAb ДНК вектора экспрессии тяжелой цепи типа «впадина», ДНК вектора экспрессии тяжелой цепи типа «выступ» и ДНК вектора экспрессии легкой цепи использовали для трансфекции в отношении 0,5:0,5:1.

В день, предшествующий трансфекции, концентрацию клеток ExpiCHO™ (Gibco, номер по каталогу A29127) в экспрессионной среде ExpiCHO™ (Gibco, номер по каталогу A29100-01) корректировали до $3-4 \times 10^6$ жизнеспособных клеток на мл и затем проводили инкубацию при 8% CO₂, 37°C и 120 об/мин на протяжении 1 суток. В день трансфекции ДНК проводили разведение клеток, выращенных до $7-10 \times 10^6$ жизнеспособных клеток на мл, с показателями выживаемости 95% или более свежей средой до 6×10^6 жизнеспособных клеток на мл.

Для трансфекции исходных клеток подготавливали комплекс ExpiFectamine™ CHO и плазмидной ДНК с использованием набора для трансфекции ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit (Gibco, номер по каталогу A29129). ДНК и реагенты ExpiFectamine™ CHO подготавливали в подходящих концентрациях, вносили в старую среду OptiPRO™ SFM® (Gibco, номер по каталогу 12309019) и перемешивали, оставляя при комнатной температуре на 5 минут. Полученный продукт добавляли к исходным клеткам и начинали их посттрансфекционное культивирование. На следующий день после трансфекции к трансфицируемым клеткам добавляли реагенты Enhancer и Feed, входящие в состав набора ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit, через 5 суток еще раз добавляли реагент Feed и проводили инкубацию на протяжении 10 суток при 8% CO₂, 37°C и 120 об/мин с получением трансфицированных клеток.

10-4: Сбор среды

Для получения культурального раствора по завершении продуцирования культуральную среду переносили в центрифужную бутылку для центрифугирования и центрифугировали при 4°C и 6500 об/мин на протяжении 30 минут с последующей фильтрацией через фильтр размером 0,2 мкм, получая культуральную среду без взвешенных твердых частиц. Затем полученную культуральную среду использовали для последующей очистки.

Пример 11. Получение антитела к IGF1R (scFv)**11-1: Получение антитела к IGF1R (scFv)**

Моноклональные антитела получали с применением методики фагового дисплея / пэннинга. Конкретно, антигены, использованные в пэннинге с фаговым дисплеем и других анализах, использовали в виде следующих белков. Пептид, состоящий из остатков 31-932 аминокислотной последовательности SEQ ID NO:99, где из внеклеточного домена человеческого IGF1R была удалена сигнальная последовательность, метили гистидином на С-конце и использовали для данного примера (R&D Systems, США, 391-GR). IGF1R обезьяны (Национальный научно-исследовательский совет Канады), мышиный IGF1R (R&D Systems, 6630-GR/CF) и крысиный IGF1R (Национальный научно-исследовательский совет Канады) с His-меткой на С-конце использовали в качестве антигена для анализа межвидовой перекрестной реактивности.

1×10^{10} клеток полученной библиотеки scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент), обладавших разнообразием и имевших происхождение от человека (получены SHIM Hyunbo в Женском университете Ихва), вносили в 2X среду YT (17 г триптона (CONDA, 1612.00), 10 г дрожжевого экстракта (CONDA, 1702.00) и 5 г NaCl (Sigma, S7653)), содержащую 34 мкг/мл хлорамфеникола (Sigma, C0857), 2% глюкозы (Sigma, G5400) и 5 mM MgCl₂ (Sigma, C0857), при 30°C на 3 часа до OD600 0,5-0,7. Затем клетки инфицировали фагом-помощником и культивировали в 2X среде YT, содержащей 34 мкг/мл хлорамфеникола, 5 mM MgCl₂, 70 мкг/мл канамицина (Sigma, K1876) и 1 mM IPTG (ELPISBIO, IPTG025), при 30°C на протяжении 16 часов для индукции упаковки фагов. Затем культуральный раствор центрифугировали при 4500 об/мин и 4°C на протяжении 15 минут. В супернатант добавляли 4% ПЭГ 6000 (Fluka, 81253) и 3% NaCl (Sigma, S7653) и проводили инкубацию на протяжении 1 часа на льду. Полученный продукт центрифугировали при 8000 об/мин на протяжении 20 минут при 4°C, затем осадок суспендировали в PBS и центрифугировали снова при 4°C и 12000 об/мин на протяжении 10 минут с получением супернатанта, содержащего фаговую библиотеку. Полученный супернатант хранили при 4°C до последующего использования.

11-2: Пэннинг с фаговым дисплеем

Для скрининга человеческого антитела к IGF1R проводили три раунда пэннинга, как описано ниже. Фаговая библиотека представляла собой синтетическую библиотеку

человеческих scFv, а процедура пэннинга с фаговым дисплеем и полученные результаты показаны в Таблице 19.

[Таблица 19]

Стадия		Пэннинг		
		1-й раунд	2-й раунд	3-й раунд
Антиген		ECD IGF1R (биотинилированный)	ECD IGF1R (биотинилированный)	Клетки MCF-7
Метод сорбции		Непрямая иммобилизация	Непрямая иммобилизация	–
Исходное количество		$7,0 \times 10^{12}$	$6,0 \times 10^{12}$	$5,0 \times 10^{12}$
Выход	IGF1R или MCF-7	$4,9 \times 10^8$	$3,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
Промывка	PBS-T**	5 раз	10 раз	10 раз
	PBS	2 раза	2 раз	2 раз

Конкретно, 1 мл рекомбинантного человеческого белка IGF1R в концентрации 5 мкг/мл (R&D Systems, США, 391-GR, или Sino Biological Life Technologies, США, 10164-H08H-50R) вносили в иммунологическую пробирку (Maxisorp 444202) и сорбировали на поверхность иммунологической пробирки при 4°C на протяжении 16 часов. Затем супернатант удаляли и проводили инкубацию с добавлением PBS, содержавшего 3% BSA, при 37°C на протяжении 1 часа для блокировки неспецифического связывания посредством связывания BSA с поверхностью, не связанной с IGF1R. После удаления супернатанта фаговую библиотеку, полученную в Примере 11-1, смешанную с 1,5% раствором BSA, помещали в иммунологическую пробирку и проводили взаимодействие при 37°C на протяжении 1 часа, позволяя IGF1R-специфичным фагам связаться с антигеном. Затем полученный продукт промывали раствором PBS-T (забуференный фосфатом физиологический раствор с 0,05% Tween 20) для удаления фагов, связанных неспецифично, и фаги, связанные с IGF1R, собирали с использованием 100 мМ раствора триэтиламина.

Собранные фаги нейтрализовали буферным раствором с 1 М трис (pH 7,4), трансфицировали *E. coli* K12 ER2738 при 37°C на протяжении 1 часа и инфицированные *E. coli* распределяли по агаровой среде LB, содержавшей тетрациклин и карбенициллин, и культивировали при 37°C в течение ночи. На следующий день культивированные *E. coli* суспендировали в 5 мл среды SB (superbroth), содержавшей

тетрациклин и карбенициллин, и добавляли равный объем 50% глицерина. Одну часть хранили при -80°C , а 50 мкл продукта суспендировали в 40 мл среды SB (superbroth), содержащей тетрациклин и карбенициллин, добавляли 10^{12} БОЕ фага-помощника VCSM13 и проводили культивирование с перемешиванием при 37°C на протяжении 1 часа. Затем в культуральный раствор добавляли канамицин и проводили культивирование при 30°C на протяжении приблизительно 16 часов, культивируя только *E. coli*, инфицированные фагом-помощником.

На следующий день, после центрифугирования культурального раствора, отбирали супернатант и вносили его в буфер, содержащий 4% ПЭГ 8000 и 3% хлорида натрия (NaCl), проводили взаимодействие при 4°C на протяжении приблизительно 1 часа, фаги осаждали и проводили центрифугирование. После удаления супернатанта пул осажденных фагов ресуспендировали в PBS-буфере, содержащем 1% BSA, и использовали для следующего раунда пэннинга. Во время более поздних раундов пэннинга число промывок с использованием PBS-T увеличивали для увеличения количества и концентрации антигенспецифичных фагов.

11-3: Скрининг отдельных клонов

Проводили отбор клеточных клонов, демонстрировавших аффинность связывания с ECD (внеклеточный домен) человеческого IGF1R и MCF-7, экспрессирующими IGF1R.

Конкретно, для отбора моноклональных антител, специфично связывающихся с IGF1R, из пула фагов, полученного в Примере 11-2, проводили следующий эксперимент.

Для выделения моноклонов из концентрированного пула, пул фагов, полученных на агаровой среде LB с тетрациклином/карбенициллином, высевали на среду и культивировали, получая отдельные колонии. После посева этих колоний в глубокий 96-луночный планшет и инкубации в течение ночи 10 мкл полученного культурального раствора еще раз вносили в глубокий 96-луночный планшет и инкубировали таким же образом при 37°C на протяжении приблизительно 4 часов до получения подходящей OD (от 0,5 до 0,7). После добавления 20 MOI фага-помощника в культуральный раствор полученную смесь подвергали взаимодействию при 37°C на протяжении 1 часа. Затем в культуральную среду добавляли канамицин и проводили культивирование в течение ночи при 30°C . На следующий день культуральную среду

центрифугировали и отбирали супернатант для проведения ELISA для отбора IGF1R-специфичных фагов (Steinberger, Rader and Barbas III. 2000. Phage display vectors. In: Phage Display Laboratory Manual. 1sted. Cold Spring Harbor Laboratory Press NY. USA. Pp.11.9-11.12).

По 100 нг рекомбинантного IGF1R вносили в каждую лунку планшета для ELISA и проводили взаимодействие при 4°C на протяжении приблизительно 15 часов для сорбции антигена на планшет. Для предотвращения неспецифического связывания в каждую лунку вносили по 200 мкл PBS-буфера, содержавшего 3% BSA, и проводили взаимодействие при 37°C на протяжении приблизительно 1 часа. Супернатант удаляли.

В каждую лунку вносили по 100 мкл раствора, содержавшего полученный моноклональный фаг, проводили взаимодействие при 37°C на протяжении 1 часа и 3-кратную промывку с использованием 300 мкл PBS-T. Для выявления фага, связанного с антигеном IGF1R, антитело против HA с HRP разводили 1:5000 в PBS-буфере, содержавшем 3% BSA, и проводили взаимодействие при 37°C на протяжении 1 часа. После 3-кратной промывки с использованием 300 мкл PBS-T вносили 100 мкл ТМВ (тетраметилбензидин, Sigma, T0440) для окрашивания, а для остановки реакции вносили 50 мкл 1 Н H₂SO₄. Измеряя оптическую плотность при 450 нм, отбирали клоны с высокой оптической плотностью по сравнению с контрольной группой BSA как клоны антигенспецифичных антител.

При двукратном скрининге были отобраны семь (7) видов клонов: 1564, 48G5, 49G11, 54H4, 60A11, 60H6 и B11.

Пример 12: Получение аффинного варианта антитела к IGF1R

Антитела оптимизировали, варьируя аффинность отобранных клонов, посредством оценки их способности к связыванию с лигандом и проникновению через ГЭБ. В первом эксперименте получали ручную смесь NNS-праймеров для рандомизации CDR2 тяжелой цепи и CDR3 легкой цепи на основе scFv 1564 и ген scFv 1564, содержавший рандомизационную последовательность, амплифицировали с применением методики ПЦР. Амплифицированные генные продукты вводили в вектор pComb3x с получением библиотеки в форме, подходящей для фагового дисплея, и при пэннинге с использованием этой библиотеки и ELISA-скрининге удалось отобрать несколько клонов scFv, которые связывались с IGF1R. У отобранных клонов определяли аминокислотную последовательность вариабельной области посредством секвенирования генов.

Во втором эксперименте конструировали две минибibliothеки тяжелой и легкой цепи с введением обратной мутации эмбрионального типа в CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно. По результатам анализа 96 колоний было подтверждено, что 31 клон VL и 39 клонов VH имели уникальные последовательности. В итоге, при отборе аффинных вариантов на основе продуктивности и аффинности связывания клонов с антигеном были получены клоны.

Пример 13. Получение вариантов антител, имеющих остаток, подверженный дезамидированию

13-1: Определение остатка, подверженного дезамидированию

При дезамидировании в области CDR происходит деградация антитела и ослабление его связывания с антигеном, что может приводить к снижению эффективности и к неоднородности образцов. Неоднородность образцов приводит к сложностям при его идентификации в клинических исследованиях. Поэтому была предпринята попытка определить положения, по которым происходит дезамидирование, с применением компьютерного анализа и пептидного картирования.

Как показано на Фиг. 8а, при компьютерном анализе и пептидном картировании был установлен факт дезамидирования исходного клона 1564. Для этого образцы хранили при 4°C или 40°C на протяжении одной недели до анализа, и было подтверждено, что дезамидирование происходит в L-CDR2, L-CDR3 и H-CDR2. Для подтверждения мест дезамидирования были также проанализированы аффинные варианты, раскрытые в Примере 12.

13-2: Получение вариантов антител

При компьютерном анализе исходный клон 1564 имел результирующий заряд – 0,7. Обычно при результирующем заряде менее 0 или более 5,5 антитело подвержено быстрому клиренсу в организме. Поэтому предполагается, что замена остатков, подверженных дезамидированию, на положительные заряды, такие как H, R, K и так далее, позволит предотвратить быстрый клиренс благодаря устранению дезамидирования и увеличению общего заряда. Таким образом, были получены мутанты с заменами сайтов дезамидирования, как показано на ФИГ. 18b.

Для удаления остатка, подверженного дезамидированию, получали мутант, имеющий замену по этому остатку, следующим образом.

1) В аминокислотной последовательности Asn заменяли на D или Q, сходные с Asn. При отсутствии изменений аффинности связывания мутанта все остатки заменяли на Q.

2) Поскольку результирующий заряд исходного клона составлял $-0,7$, а результирующий заряд, приводящий к быстрому клиренсу, составляет менее 0 или более 5,5, предпочтительно, чтобы заряд стал положительным. Поэтому N95a, остаток L-CDR3, подверженный дезамидированию, заменяли на H, R и K, имеющие положительный заряд.

Пример 14. Получение различных форм антител против IGF1R

14-1: Получение минитела против IGF1R

Минитело получали соединением полноразмерного scFv IGF1R-специфичного моноклонального фагового антитела, полученного в Примерах 11-13, с C-концом Fc. Для этого получали нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность scFv, как раскрыто в настоящем изобретении, и полученную нуклеотидную последовательность расщепляли рестриктазой и клонировали в вектор экспрессии на основе pcDNA, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую Fc.

14-2: Получение бивалентного антитела против IGF1R

Получали полноразмерный scFv IGF1R-специфичного моноклонального фагового антитела, полученного в Примерах 11-13, и два полноразмерных scFv связывали с каждым C-концом терапевтического антитела в форме IgG с получением бивалентного антитела. Для этого получали нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность scFv, как раскрыто в настоящем изобретении, расщепленную рестриктазой, и клонировали ее в вектор экспрессии на основе pcDNA, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую терапевтическое антитело.

14-3: Получение IgG-антитела (Full-IgG) против IGF1R

Для преобразования последовательностей антитела 1564 и антитела F06 в форму полноразмерных IgG1 (Full IgG) IGF1R-специфичных моноклональных фаговых антител, полученных в Примерах 11 и 12, синтезировали нуклеотидные последовательности областей тяжелой цепи и легкой цепи (Genotec Inc.). Синтезированные гены тяжелой цепи и легкой цепи клонировали в векторы экспрессии.

14-4: Получение моновалентного антитела с scFv против IGF1R

В Примере 14-1 представлена форма минитела, где scFv-форма антитела против IGF1R связана с каждым С-концом двух Fc тяжелой цепи. В данном примере один scFv связан с С-концом только одного Fc тяжелой цепи. В форме антитела, полученной в Примерах 11-13, конструировали вектор, где IGF1R-специфичные моноклональные фаговые антитела 1564, F06, C04, VH5, VH16, VH35, VH9, VH2, VH7 и VH32 были связаны с С-концом только одного Fc, и вектор без антитела против IGF1R, связанного с С-концом. При получении антител в клетках в Fc-области вводили мутации типа «выступ во впадину» для получения гетеродимерной формы. При трансфекции в клетки CHO-S для получения антитела все три вектора, в том числе вектор, соответствующий тяжелой цепи, в которой антитело против IGF1R связано с С-концом Fc терапевтического антитела, вектор, соответствующий тяжелой цепи, в которой антитело против IGF1R не связано с С-концом Fc терапевтического антитела, и вектор, соответствующий легкой цепи терапевтического антитела, были инъецированы в клетки CHO-S.

14-5: Экспрессия и очистка различных антител против IGF1R

Векторы, полученные в Примерах 14-1, 14-2 14-3 и 14-4, вводили в клетки следующим образом.

Конкретно, концентрацию клеток CHO-S доводили до $1,5 \times 10^6$ клеток/мл в среде CD-CHO (Gibco, 10743) и затем проводили культивирование при 8% CO₂ и 37°C на протяжении 1 суток. В день трансфекции ДНК проводили подготовку клеток, выращенных до $2,5-3 \times 10^6$ клеток/мл, в концентрации $2,1 \times 10^6$ клеток/мл с использованием среды CD-CHO, содержащей 1% DMSO, и затем культивировали их в условиях 8% CO₂ и 37°C на протяжении 3 часов. После центрифугирования при 3000 об/мин на протяжении 15 минут супернатант удаляли и проводили ресуспендирование в среде RPMI 1640 с 2,5% FBS.

Затем комбинацию векторов разводили в среде Opti-MEM до концентрации 1 мкг на мл среды и PEI (Polysciences, 23966, исходная концентрация 1 мг/мл) разводили до 8 мкг/мл культуральной среды. После смешивания ДНК со смесями PEI и оставления полученной смеси при комнатной температуре на 10 мин эту смесь выливали во флакон, содержащий клетки, и проводили инкубацию на протяжении 4 часов при 5% CO₂, 37°C, 100 об/мин. Затем смесь культивировали с добавлением

среды CD-CHO в объеме, равном объему культуры, и инкубировали при 8% CO₂, 37°C, 110 об/мин на протяжении 4 суток.

Полученный культуральный раствор пропускали через MabSelect SuRe (GE healthcare, 5 мл), уравновешенную пропусканием уравнивающего буфера (50 mM трис-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl), позволяя экспрессированному антителу связаться с колонкой. Затем, после элюирования раствором 50 mM цитрата натрия (pH 3,4) и 100 mM NaCl проводили нейтрализацию с использованием 1 M трис-HCl (pH 9,0) таким образом, что конечный pH составлял 7,2. После этого проводили замену буферного раствора с использованием PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор, pH 7,4) и, когда степень чистоты была высокой, полученный раствор хранили при -20°C, а при необходимости дополнительной очистки хранили его при 4°C до последующей очистки.

Когда была необходима дополнительная очистка, ее проводили с использованием HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare, номер по каталогу 28-9893-36) с возможностью применения различных вариантов эксклюзионной хроматографии. После уравнивания уравнивающим буфером (1x забуференный фосфатом физиологический раствор, pH 7,4, Gibco, номер по каталогу 10010-023) образец, прошедший первичную очистку, загружали на колонку. Полученный образец, прошедший полную очистку, хранили в замороженном состоянии при -20°C.

14-6: Получение биспецифичного антитела с антителом против альфа-синуклеина

Антитело против IGF1R в форме scFv по настоящему изобретению получали связыванием вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи с использованием линкера (SEQ ID NO:411) и соединяли его с С-концом константной области тяжелой цепи полноразмерной IgG-формы антитела против альфа-синуклеина, описанного в следующей таблице, с использованием линкера (SEQ ID NO:412), получая биспецифичное антитело. В данном примере моновалентное антитело получали связыванием одной молекулы scFv-формы антитела против IGF1R на молекулу IgG-антитела против альфа-синуклеина, а бивалентное антитело получали связыванием двух молекул scFv-формы антитела против IGF1R на молекулу IgG-антитела против альфа-синуклеина, соответственно. Последовательности антитела против альфа-синуклеина, использованных для получения биспецифичного антитела в данном примере, и примеры биспецифичных антител, полученных в соответствии с настоящим изобретением, описаны в Таблице 17. Биспецифичные антитела, примеры

которых приведены в Таблице 17, были использованы для экспериментов в последующих примерах.

Пример 15. Анализ IGF1R-специфичной аффинности связывания с использованием антитела против IGF1R

15-1: Анализ IGF1R-специфичной аффинности связывания с использованием антитела против IGF1R в форме минитела (ELISA)

Проводили ELISA-анализ для оценки аффинности связывания и зависимость от концентрации связывания клонов 996, 1226, 1564 и МКJP2 в форме минител, полученных в Примере 14-1, с рекомбинантным IGF1R.

Конкретно, человеческий рекомбинантный IGF1R, являющийся мишенью, с которой связывается антитело, представляет собой внеклеточный домен (ECD) и был приобретен у R&D Systems (6630-GR/CF). Человеческий IGF1R разводили до 1 мкг/мл в PBS-буфере, вносили в 96-луночный планшет для ELISA (Nunc-Immuno Plates, NUNC, Рочестер, штат Нью-Йорк) в количестве 100 мкл на лунку, сорбировали, проводя взаимодействие при 4°C на протяжении 16 часов, и затем удаляли супернатант. Добавляли PBS-буфер, содержащий 3% BSA (бычий сывороточный альбумин), 200 мкл на лунку, и проводили взаимодействие на протяжении 2 часов для блокировки неспецифического связывания.

Проводили 3-кратное разведение минител клонов 996, 1226, 1564 и МКJP2, полученных в Примере 14-1, начиная с максимальной концентрации 20 нМ, с получением 12 точек, затем переносили по 100 мкл в каждую лунку и оставляли при комнатной температуре на 1 час. После этого планшет промывали 4 раза PBS-буфером, содержащим 0,05% Tween 20, и проводили взаимодействие при комнатной температуре на протяжении часа, добавляя в каждую лунку по 100 мкл противочеловеческого антитела с HRP, распознававшего человеческий Fc минитела, в разведении 1:5000 в блокирующем буфере. После 4-кратной промывки с использованием 300 мкл PBS-T (Tween 20, 0,05%) проводили окрашивание с использованием ТМВ (тетраметилбензидин, Sigma, T0440). Ферментативную реакцию гасили серной кислотой, 0,5 моль/л, и оптическую плотность определяли и анализировали при 450 нм с использованием устройства для прочтения микропланшетов. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 1а.

Было подтверждено, что четыре клон минител связывались с человеческим рекомбинантным белком IGF1R зависимым от концентрации образом, и, конкретно, МКJP2 продемонстрировал наиболее высокую связывающую способность, и, после него, клоны 996 и 1564 продемонстрировали сходную силу связывания, а клон 1226 продемонстрировал несколько меньшую силу связывания.

15-2: ELISA-анализ межвидовой перекрестной реактивности антител к IGF1R

Активность антитела 1564 против IGF1R, полученного методом, описанным в Примере 14-2, и антител против IGF1R, полученных в Примере 11-3, по межвидовому перекрестному связыванию анализировали посредством ELISA-анализа. С этой целью сначала разводили антигены IGF1R человека, обезьяны, мыши и крысы до 1 мкг/мл, вносили по 100 мкл в каждую лунку и проводили взаимодействие при 4°C на протяжении 15 часов для их сорбции на дно планшета. После удаления супернатанта в каждую лунку вносили по 200 мкл PBS-буфера, содержавшего 3% BSA, для блокировки неспецифического связывания. Проводили 5-кратное разведение антител против IGF1R в PBSB (BSA, 3% в PBS) от максимальной концентрации 400 нМ, вносили их в каждую лунку и проводили взаимодействие при 37°C на протяжении 1 часа. Затем, после 5-кратной промывки PBS-буфером, антитело против человеческого Fab с HRP, распознающее Fab-часть связанного антитела, разводили 1:20000, вносили по 100 мкл в каждую лунку и проводили взаимодействие при 37°C на протяжении 1 часа. Полученный продукт промывали 5 раз PBS-буфером и проводили окрашивание с использованием ТМВ (тетраметилбензидин, Sigma, T0440), следуя методу изготовителя. Ферментативную реакцию гасили серной кислотой, 0,5 моль/л, и оптическую плотность измеряли при 450 нм с использованием устройства для прочтения микропланшетов (Molecular Devices). При включении в ELISA-анализ большого количества образцов использовали два планшета. Результаты эксперимента показаны в Таблице 12 ниже.

Конкретно, в Таблице 12 результатов ELISA биспецифичных антител к человеческому IGF1R результаты ELISA IgG 1564 и биспецифичных антител с человеческим IGF1R, мышинным IGF1R, крысиным IGF1R и IGF1R обезьяны показаны в Таблице 12.

Результаты эксперимента, изложенные ниже, демонстрируют преимущество оценки эффективности с применением моделей у различных видов животных и показывают, что эффективность терапевтических агентов в моделях заболеваний у

различных видов можно оценивать с использованием антител по настоящему изобретению.

[Таблица 20] Результаты ELISA-анализа способности антител к связыванию с IGF1R различных видов

Эксперимент	Клон антитела	EC ₅₀ (нМ)
ELISA с человеческим IGF1R	ch11F11-1564	0,914
	ch11F11-48G5	1,21
	ch11F11-54H4	2,88
	ch11F11-60H6	10
	ch11F11-B11	7,13
ELISA с человеческим IGF1R	1564 IgG	0,0823
	ch11F11-1564	0,379
ELISA с мышинным IGF1R	ch11F11	N/A*
	ch11F11-1564	3,02
	ch11F11	N/A*
	ch11F11-48G5	6,2
	ch11F11-54H4	N/A
	ch11F11-60H6	18,6
	ch11F11-B11	148
ELISA с крысиным IGF1R	ch11F11	N/A*
	ch11F11-1564	1,05
	ch11F11-48G5	2,44
	ch11F11-54H4	14,2
	ch11F11-201**	N/A*
	ch11F11-1564	0,874
	ch11F11-60H6	38
	ch11F11-B11	35,1

ELISA с IGF1R обезьяны	ch11F11	N/A*
	ch11F11-1564	2,48
	ch11F11-48G5	6,69
	ch11F11-54H4	8,83
	ch11F11-201**	N/A*
	ch11F11-1564	2,21
	ch11F11-60H6	N/A
	ch11F11-B11	180

* недоступно

** scFv-форма биоаналога герцептина

15-3: Анализ аффинности связывания аффинных вариантов с IGF1R (FACS)

Аффинность связывания аффинных вариантов, полученных в Примере 12, оценивали посредством ELISA с ECD IGF1R, а аффинность связывания с MCF-7 анализировали посредством FACS.

В качестве анализа первичных клонов в Таблице 21 показаны результаты ELISA-анализа соответствующих первично отобранных клонов в форме биспецифичных антител с ECD IGF1R, а в Таблице 22 показаны результаты анализа аффинности связывания с клеточной линией MCF-7 посредством FACS.

[Таблица 21] Результаты ELISA связывания первично отобранных клонов в форме биспецифичных антител с ECD IGF1R

Клон антитела	EC ₅₀ (нМ)
ch11F11-1564	0,442
ch11F11-A06	1,19
ch11F11-A07	1,2
ch11F11-B02	0,919
ch11F11-B09	1,08
ch11F11-1564	0,49
ch11F11-D03	0,666
ch11F11-E06	0,668
ch11F11-F06	0,467
ch11F11-H04(G)	0,67
Hu3A9-1564	0,144

Hu3A9-A02	0,13
Hu3A9-A07	0,125
Hu3A9-B10	0,156
Hu3A9-B01	0,145
Hu3A9-C04	0,107
Hu3A9-E09	0,159

[Таблица 22] Результаты FACS-анализа связывания с клеточной линией MCF-7

Образцы	Среднее геометрическое
Только 2-е антитело	2,92
Исходное 1564	4,09
F06	5,02
A07	5,06
B02	4,54
B09	4,29
D03	4,09
E06	4,24
F06	6,33
C04	3,88

В результате, клон F06 был отобран как клон, обладающий наиболее высокой связывающей способностью при связывании с клетками по сравнению с исходным клоном (клон 1564) (созревание аффинности), а клон C04 был отобран как клон с наименее высокой связывающей способностью при связывании с клетками по сравнению с исходным клоном 1564 (снижение аффинности).

В качестве анализа вторичных клонов в Таблице 23 показаны результаты ELISA связывания клонов, полученных вторично, в форме биспецифичных антител с ECD IGF1R.

[Таблица 23] Результаты ELISA вторично отобранных клонов с ECD IGF1R

Клон антитела	EC ₅₀ (нМ)
Hu11F11(ver.2)-1564	0,259
Моновалентное ch11F11-1564	0,347
Hu11F11(ver.2)-C04	0,15

Hu11F11(ver.2)-F06	0,147
Hu11F11(ver.2)-1564	0,864
ch11F11-F06	0,857
Hu11F11(ver.2)-VH2	135
Hu11F11(ver.2)-VH5	0,366
Hu11F11(ver.2)-1564	0,157
Hu11F11(ver.2)-VH7	402
Hu11F11(ver.2)-VH9	6,06
Hu11F11(ver.2)-VH16	0,236
Hu11F11(ver.2)-1564	0,149
Hu11F11(ver.2)-VH32	121
Hu11F11(ver.2)-VH35	0,167
Hu11F11(ver.2)-VH27	N/A*

Клоны для анализа посредством FACS были отобраны, как показано в Таблице 24, после того как из вторично полученных клонов были исключены клоны с существенно сниженной продуктивностью и ухудшенными физическими свойствами.

[Таблица 24] Клоны для анализа с применением FACS-анализа

Категория связывания	аффинности	Клон антитела	Пояснение
Аффинность сходна с клоном 1564	связывания исходным	C04	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		F06	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		VH5	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		VH16	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		VH35	FACS и анализ <i>in vivo</i>
Аффинность снижена в 50 раз	связывания	VH9	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		C12	Нежелательные физические свойства
Аффинность снижена в 50 раз или более	связывания	VH2	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		VH6	Нежелательные физические свойства
		VH7	FACS и анализ <i>in vivo</i>
		VH27	Нежелательные физические свойства
		VH32	FACS и анализ <i>in vivo</i>

На Фиг. 12с представлены результаты анализа связывания клонов с клеточной линией MCF-7 с применением FACS, и все проанализированные клоны обладали

меньшей аффинностью связывания с MCF-7, чем исходный клон 1564. Эти результаты показывают, что клоны, продемонстрировавшие сниженную связывающую способность при ELISA, также продемонстрировали сниженную связывающую способность при FACS.

Были отобраны клоны антител F06, C04, VH2, VH5, VH7, VH9, VH16 и VH32, и аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи этих антител показаны в Таблицах 5 и 6 выше.

15-4: BIAcore-анализ с человеческим IGF1R

Анализировали способность антитела по настоящему изобретению к связыванию с человеческим IGF1R.

Степень связывания IgG-формы клона 1564 с человеческим IGF1R анализировали посредством SPR-анализа. Антитело anti-his против His-метки, связанной с ECD человеческого IGF1R как антигена, разводили до 20 мкг/мл в ацетатном буфере, pH 4,0, и затем иммобилизовали в референсном/аналитическом канале чипа CM4 до 10000 RU как целевого числа RU методом аминного сочетания. Во время захвата в качестве рабочего буфера использовали PBS и поддерживали скорость потока 30 мкл/мин. Во время ассоциации/диссоциации скорость потока составляла 40 мкл/мин, а в качестве рабочего буфера использовали PBS. Время ассоциации/диссоциации составляло 5 минут и 20 минут, соответственно. Анализ проводили в следующем порядке: 1 измерение исходных значений, активация (EDC NHS), внесение человеческого IGF1R, гашение (1 М этаноламин), 2 измерение исходных значений, ассоциация и диссоциация. Полученные результаты оценивали с применением бивалентной модели и анализировали с использованием программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software (версия 1.0, серийный номер 04Y15X11-0149).

По результатам анализа было подтверждено, что K_D IgG-антитела 1564 составляла $2,5305 \times 10^{-9}$ нМ, а K_D IgG-антитела F06 — $4,7802 \times 10^{-7}$ нМ, и все они продемонстрировали высокую способность к связыванию с человеческим IGF1R. Результаты анализа показаны на ФИГ. 11b. В частности, при получении клона 1564 в форме IgG он продемонстрировал константу диссоциации $2,5305 \times 10^{-9}$ нМ применительно к человеческому IGF1R и позволил подтвердить отсутствие значимого изменения аффинности связывания в зависимости от формы антител.

Пример 16. Анализ способности антитела против IGF1R к связыванию с клеточной линией, экспрессирующей человеческий IGF1R, и клетками эндотелия головного мозга

16-1: FACS-анализ на MCF-7

Для подтверждения того, что клоны 996, 1226 и 1564 в форме минител, полученные в Примере 14-1, связываются с эндогенным IGF1R на поверхности клеток, проводили анализ аффинности связывания с клеточными линиями, экспрессирующими человеческий IGF1R, и клетками эндотелия головного мозга с применением FACS. Степень связывания с MCF-7, известной как клеточная линия рака молочной железы, сверхэкспрессирующая IGF1R, анализировали посредством FACS.

Конкретно, каждое из трех минител разводили до 20 мкг/мл, в каждый образец вносили по $0,43 \times 10^6$ клеток линии MCF-7 и проводили взаимодействие при 4°C на протяжении 1 часа. После двукратной промывки PBS-буфером вносили человеческое антитело с FITC, разведенное 1: 500, и проводили взаимодействие при 4°C на протяжении 1 часа. После двукратной промывки PBS-буфером степень связывания минител против IGF1R измеряли с использованием прибора FACS Calibur. В качестве контроля использовали клетки MCF-7, обработанные только вторичными антителами. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 12а.

Аффинность связывания A02, A06, A07, B01, B02, B09, B10, C04, D03, E06, F06, H04 (Gly), H04 (Val), VH2, VH5, VH7, VH9, VH16, VH32 и VH35, полученных в Примере 12 и Примере 14-2, с MCF-7 анализировали таким же образом, как описано выше. В качестве исходных клонов сравнения использовали клон 1564, полученный методом, примененным в Примере 14-2, а в качестве контролей использовали клетки MCF-7, обработанные только вторичными антителами. Результаты анализа показаны в Таблице 22 и на Фиг. 12с.

Результаты описанного выше эксперимента выражали как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) образца, и три минитела scFv, аффинные варианты биспецифичных антител и исходный клон (клон 1564) специфично связывались с эндогенным IGF1R, экспрессированным на поверхности клеток. Эти результаты демонстрируют, что клоны, полученные в описанных выше примерах, могут быть использованы по своему целевому назначению посредством их связывания с IGF1R в форме, фактически присутствующей в организме.

16-2: FACS-анализ на JMT-1 и BT474

Минитела клонов 996, 1226 и 1564, полученные в Примере 14-1, анализировали почти таким же образом, за исключением того, что вместо клеточной линии MCF-7, использованной в Примере 16-1, использовали клеточные линии рака молочной железы JMT-1 и BT474. Связывание с эндогенным IGF1R на поверхности клеток было подтверждено морфологически. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 12а.

Результаты описанного выше эксперимента выражали как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) соответствующего образца, и было подтверждено, что три проанализированных минитела scFv специфично связывались с эндогенным IGF1R на поверхности различных клеточных линий, экспрессирующих IGF1R.

16-3: FACS-анализ клеток эндотелия головного мозга мыши

Анализировали возможное связывание клона 1564 в форме биспецифичного антитела, полученного методом, примененным в Примере 14-2, и в форме IgG, полученного методом, примененным в Примере 14-3, с клетками эндотелия головного мозга bEND.3. В этой связи в качестве отрицательных контролей использовали группу обработки только вторичным антителом и группу обработки только терапевтическим антителом в форме IgG (CH11F11). FACS-анализ проводили таким же образом, как в Примерах 16-1 и 16-2. Результаты анализа показаны на Фиг. 12b.

Все проанализированные клоны продемонстрировали связывание с bEND.3, за исключением отрицательных контролей. Эти результаты подтверждают, что различные формы клона 1564 специфично связываются с IGF1R, экспрессированным на поверхности клеток эндотелия головного мозга.

Пример 17. Анализ внутриклеточной интернализации антитела против IGF1R

17-1: Анализ интернализации MCF-7 — 1564, 996, 1226, MKJP2 (минитела)

Данный пример проводили для проверки того, проходят ли клоны 996, 1226, 1564 и MKJP2 в форме минител, полученные в Примере 14-1, внутриклеточную интернализацию клеточной линией, экспрессирующей IGF1R, и проходят ли эти антитела, проникнув в клетки, через путь RMT, не подвергаясь деградации. Для того чтобы антитело против IGF1R можно было использовать в качестве переносчика для повышения способности к проникновению через ГЭБ, оно должно проходить интернализацию клетками эндотелия головного мозга, составляющими ГЭБ.

Внутриклеточную интернализацию антител по настоящему изобретению анализировали с использованием клеточной линии MCF-7, экспрессирующей IGF1R.

Конкретно, после высева 30000 клеток линии MCF-7 в 8-луночное предметное стекло клетки культивировали на протяжении 1 суток. В каждую лунку с культивированными клетками вносили минителя клонов 996, 1226, 1564 и МКJP2, полученные в Примере 14-1, в концентрации 5 мкг/мл при 4°C на 2 часа, проводили трехкратную промывку холодной средой DMEM и вносили антитело против человеческого Fc, конъюгированное с Alexa488, при 4°C на 1 час.

Для оценки интернализации комплексов антител планшет переносили в CO₂-инкубатор и инкубировали при 37°C на протяжении 30 минут. Культуру фиксировали, добавляя 100% метанол, и одновременно останавливали реакцию. После фиксации планшет промывали 3 раза с использованием PBS. На флуоресцентном микроскопе степень интернализации антитела визуализировали в области зеленого фильтра (Alexa488). При визуализации ядра внутри клеток окрашивали с использованием DAPI для подтверждения расположения каждой лунки. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 13а.

По результатам эксперимента было показано, что все четыре антитела, проанализированные в данном эксперименте с использованием клеточной линии MCF-7, хорошо проходили интернализацию. В частности, было обнаружено, что клоны МКJP2 и 1564 были подвержены интернализации в большей степени, чем другие клоны.

17-2: Анализ интернализации MCF-7 — C04, F06, VH5, VH16, VH35, VH9, VH2, VH7, VH32

Связывание вариантов 1564, обладающих измененной способностью к связыванию с IGF1R, с IGF1R на поверхности клеток анализировали посредством FACS-анализа с использованием клеточной линии MCF-7, экспрессирующей IGF1R. 2 x 10⁵ клеток MCF-7 обрабатывали биспецифичным антителом, полученным с использованием scFv-антитела против IGF1R, в концентрации 10 мкг/мл на протяжении 30 минут. После промывки PBS-буфером, содержащим 1% BSA, вносили вторичное антитело, связанное с FITC, для выявления человеческих антител на 1 час. После промывки PBS-буфером FACS-анализ позволил подтвердить внеклеточное связывание и интернализацию различных вариантов с измененной аффинностью связывания.

Как показано в Таблице 25, было обнаружено, что биспецифичное антитело, содержащее антитело 1564 к IGF1R, при 37°C демонстрирует большую интернализацию и большую интенсивность, чем в условиях охлаждения. Эти

результаты показывают, что варианты 1564 хорошо связываются с клетками и проходят интернализацию клетками зависимым от связывания образом.

[Таблица 25]

Образец	Среднее геометрическое
	Интернализация при 37°C
Без обработки	1,88
Только 2-е антитело	2,86
hu3A9 WT	3,4
hu3A9x1564 WT	7,72
hu11F11 WT	3,18
hu11F11x1564 WT	7,34
hu3A9x1564_C04	7,23
hu3A9x1564_F06	19,8
hu11F11x1564_VH5	6,1
hu11F11x1564_VH16	5,83
hu11F11x1564_VH35	7,28
hu11F11x1564_VH9	5,01
hu11F11x1564_VH2	3,19
hu11F11x1564_VH7	3,84
hu11F11x1564_VH32	3,24

17-3: Анализ интернализации клетками эндотелия головного мозга человека

Проверяли, проходят ли бивалентная форма и моновалентная форма клона 1564, полученные в Примерах 14-2 и 14-4, интернализацию первичными эндотелиальными клетками микрососудов головного мозга человека (НМБЕС). В качестве отрицательного контроля использовали терапевтическое антитело IgG (11F11).

НМБЕС (Cell Systems, номер по каталогу ACBRI376) высевали в 12-луночный планшет до 90% смыкания монослоя с последующим внесением анализируемого антитела. На следующий день после фиксации 4% параформальдегидом и промывки с использованием PBS проводили блокировку и пермеабиллизацию с использованием раствора, содержавшего 3% BSA и TritonX, на протяжении 50 минут. После промывки PBS антитело против человеческого Fc (козье противочеловеческое антитело) инкубировали на протяжении 2 часов и 30 минут, проводили промывку с использованием PBS и вносили вторичное антитело против соответствующего

первичного антитела на 1 час. После промывки PBS клетки окрашивали красителем Hoechst на протяжении 10 минут в концентрации 1:1000 для окрашивания ядер. Результаты анализировали в условиях LSM 780 NLO EC Plan-Neofluar 100X / 1.3 Oil на конфокальном микроскопе. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 13b.

Бивалентная форма и моновалентная форма клона 1564 продемонстрировали большую нейтрализацию, чем терапевтическое антитело отрицательного контроля (11F11). Эти результаты показывают, что антитело против IGF1R, описанное выше, может эффективно обеспечивать интернализацию терапевтического антитела клетками эндотелия головного мозга, составляющими ГЭБ, в различных формах биспецифичных антител, содержащих связанное с ним терапевтическое антитело, увеличивая посредством этого способность терапевтического антитела к проникновению через ГЭБ.

17-4: Анализ дальнейших превращений антител в клетках эндотелия головного мозга человека

Если антитело интернализуется и колокализуется с лизосомальным маркером внутри клетки, то такое антитело не может проходить через ГЭБ из-за его разрушения в клетках эндотелия головного мозга. В отличие от этого, если антитело колокализуется с ранней эндосомой, ассоциированной с экзоцитозом, или известным маркером, ассоциированным с прохождением через ГЭБ, то ожидают, что это антитело пересекает ГЭБ посредством рецептор-опосредованного трансцитоза, то есть проходит интернализацию клетками эндотелия головного мозга и затем существует в головном мозге.

После такой же обработки НМВЕС бивалентной формой 1564 из антител, проанализированных в Примере 17-2, анализировали, какой клеточный компонент этих клеток колокализуется с этими антителами. Тем не менее, козьими противочеловеческими антителами, выявляющими обработанные антитела после блокировки и пермеабиллизации, обрабатывали одновременно каждое из следующих антител:

- антитело против катепсина D: лизосомальный маркер;
- антитело против кавеолина-1: маркер кавеолин-опосредованного трансцитоза (предположительно являющегося основным механизмом прохождения через ГЭБ);
- антитело против ЕЕА1: маркер ранних эндосом.

Остальные методы были такими же, как в Примере 17-2, но для маркеров использовали соответствующие вторичные антитела.

Результаты анализа показаны на Фиг. 13с. Клон 1564 в форме биспецифичного антитела не колокализировался с катепсином D, но колокализировался с кавеолином-1 и EEA1 в клеточной мембране и клетках. Эти результаты показывают, что после интернализации клон 1564 он мог проходить через ГЭБ по пути RMT, минуя механизмы внутриклеточной деградации.

Пример 18. Анализ влияния антитела против IGF1R на передачу сигналов через IGF1R

18-1: Анализ пролиферации клеточной линии MCF-7 при использовании IGF1R

Возможное влияние антитела против IGF1R по настоящему изобретению на связывание IGF1R (рецептора IGF1) с его лигандом анализировали по эффективности пролиферации клеток под действием IGF1.

Проводили 5-кратное разведение минител клонов 996, 1226, 1564 и МКJP2, полученных в Примере 14-1, от 400 нМ, соответственно, с получением разведенных образцов и затем к 25 мкл каждого разведенного образца добавляли по 25 мкл 20 нг/мл IGF1. Клетки линии MCF-7, экспрессирующие IGF1R, культивировали, пассировали, удаляя среду в день эксперимента, и в каждую лунку 96-луночного планшета, в который вносили IGF1 и анализируемое антитело, добавляли по 20000 клеток (что соответствовало 50 мкл).

После 3 суток инкубации при подходящих температуре и влажности вносили 10 мкл реагента ССК-8 для оценки степени роста клеток и проводили инкубацию в CO₂-инкубаторе на протяжении 4-5 часов. Затем планшет вынимали и измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм с использованием спектрофотометра.

Результаты эксперимента показаны на Фиг. 14А.

По результатам эксперимента было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению не ингибировало пролиферацию клеток MCF-7, вызванную передачей сигналов IGF1 через IGF1R. Антитело против IGF1R (Imclone), использованное в качестве контрольной группы, ингибировало пролиферацию клеток MCF-7, обусловленную передачей сигналов IGF1 через IGF1R, зависимым от вносимой концентрации образом. Поэтому антитело по настоящему изобретению является антителом, обладающим способностью к связыванию с IGF1R, экспрессированным на эндотелиальных клетках, составляющих ГЭБ, и к проникновению через ГЭБ, но не

ингибирует передачу сигналов IGF1 в организме. Таким образом, было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению может быть использовано в качестве переносчика через ГЭБ.

18-2: Анализ ингибирования компонентов передачи сигналов через IGF1R в клеточной линии MCF-7

Когда связывание IGF1 с клетками, экспрессирующими IGF1R, приводило к передаче сигнала в эти клетки, антитело против IGF1R по настоящему изобретению анализировали для определения связывания IGF1 с его рецептором и последующих компонентов передачи сигнала. То есть, антителом против IGF1R обрабатывали клеточные линии MCF-7, экспрессирующие IGF1R, и затем анализировали общий IGF1R, фосфорилированный IGF1R, общий Akt как последующий фактор IGF1R и количество фосфорилированного Akt в клетках.

После культивирования клеток MCF-7 культуральную среду заменяли бессывороточной культуральной средой за 20 часов до обработки антителом против IGF1R. Клетки линии MCF-7 обрабатывали минителами клонов 996, 1226, 1564 и MKJP2, полученными в Примере 4-1, в концентрации 100 нМ, соответственно, и через 1 час вносили 200 нг/мл IGF1. Через 20 минут клетки промывали с использованием PBS и затем лизировали M-PER с добавлением смеси ингибиторов протеаз и фосфатаз. После измерения концентрации белка с использованием набора для BCA-анализа 12,5 мкг белка вносили в гель для электрофореза (SDS-PAGE) и затем переносили на PVDF-мембрану. Блокировку проводили при комнатной температуре с легким покачиванием на протяжении 1 часа с использованием PBST (0,1% Tween 20), содержавшего 5% BSA, и затем проводили обработку первичным антителом против IGF1R или Akt с медленным покачиванием при 4°C в течение ночи. В качестве контроля внесения использовали антитело к бета-актину. После промывки проводили обработку вторичным антителом с медленным покачиванием при комнатной температуре на протяжении 1 часа с последующей промывкой. Добавляли ECL-раствор и сигналы наблюдали с использованием ImageQuant LAS 4000. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 14b.

По результатам эксперимента было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению не влияло на общий IGF1R, фосфорилированный IGF1R, общий Akt как последующий фактор IGF1R и количество фосфорилированного Akt в клетках.

18-3: Анализ ингибирования компонентов передачи сигналов через IGF1R в клетках эндотелия головного мозга мыши

Когда связывание IGF1 с клетками, экспрессирующими IGF1R, приводило к передаче сигнала в эти клетки, антитело против IGF1R по настоящему изобретению анализировали для определения связывания IGF1 с его рецептором и последующих компонентов передачи сигнала. То есть, клетки линии bEND3, экспрессирующие IGF1R, обрабатывали 11F11-1564, 3A9-1564 CH11F11 и ch3A9, отдельными антителами против альфа-синуклеину, описанными в публикации патента Кореи № 2018-0081465, полученными способом, примененным в Примере 14-2, и затем анализировали общий IGF1R, фосфорилированный IGF1R, общий Akt как последующий фактор IGF1R и количество фосфорилированного Akt в клетках.

Во время инкубации клеток bEND3 культуральную среду заменяли бессывороточной культуральной средой за 20 часов до обработки антителом против IGF1R. Клетки линии bEND обрабатывали биспецифичными антителами клонов 1564 и MKJP2, полученными в Примере 14-2, в концентрации 100 нМ и через 1 час вносили 200 нг/мл IGF1. Через 20 минут клетки промывали с использованием PBS и затем лизировали M-PER с добавлением смеси ингибиторов протеаз и фосфатаз. После измерения концентрации белка с использованием набора для BCA-анализа 12,5 мкг белка вносили в гель для электрофореза (SDS-PAGE) и затем переносили на PVDF-мембрану. Блокировку проводили при комнатной температуре с легким покачиванием на протяжении 1 часа с использованием PBST (0,1% Tween 20), содержащего 5% BSA, и затем проводили обработку первичным антителом против IGF1R или Akt с медленным покачиванием при 4°C в течение ночи. В качестве контроля внесения использовали антитело к бета-актину. После промывки проводили обработку вторичным антителом с медленным покачиванием при комнатной температуре на протяжении 1 часа с последующей промывкой. Добавляли ECL-раствор и сигналы наблюдали с использованием ImageQuant LAS 4000. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 14с.

По результатам эксперимента было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению не влияло на общий IGF1R, фосфорилированный IGF1R, общий Akt как последующий фактор IGF1R и количество фосфорилированного Akt в клетках.

Пример 19. Анализ нетоксичности антитела против IGF1R

19-1: Анализ ADCC антитела к IGF1R в форме IgG

Антитело против IGF1R в форме IgG по Примеру 14-3 анализировали для определения того, приводило ли оно к гибели клеток посредством IGF1R-зависимого связывания с поверхностью клеток, экспрессирующих IGF1R. То есть, набор для репортерного биологического анализа ADCC использовали для анализа активации натуральных клеток-киллеров (NK-клеток) и нежелательного влияния на клетки, экспрессирующие IGF1R, при связывании клон 1564 антитела против IGF1R с клеточными линиями, экспрессирующими IGF1R.

После инкубации клеток MCF-7, сверхэкспрессирующих IGF1R, и клеток SKBR3 с низким уровнем экспрессии IGF1R в каждую лунку 96-луночного планшета вносили по 5000 клеток за 20 часов до обработки антителом. После культивирования клеток проводили замену среды на RPMI 1640, содержащую 4% сыворотки с низким содержанием IgG, и в каждую лунку вносили клон 1564 в форме IgG в 8-кратном разведении, начиная со 133,3 нМ. В каждую лунку вносили стабилизированные ADCC-эффекторные клетки, инкубировали их на протяжении 6 часов и затем оставляли при комнатной температуре приблизительно на 10 минут. После внесения подготовленного реагента для люциферазного анализа Bio-Glo в каждую лунку измеряли степень люминесценции с использованием оборудования PHERAstar FS, BMG LABTECH, анализируя степень индукции ADCC. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 15а.

По результатам эксперимента было подтверждено, что антитело по настоящему изобретению, в частности клон 1564, связывалось с клетками MCF-7, представляющими собой клеточную линию, сверхэкспрессирующую IGF1R, и клетками SKBR3 с низким уровнем экспрессии IGF1R, но не индуцировало ADCC эффекторными клетками.

19-2: Анализ уровня IGF1R в головном мозге после многократного введения антитела против IGF1R

Антитела, используемые в качестве переносчиков через ГЭБ, связываются с рецепторами-мишенями на клетках эндотелия головного мозга, увеличивая проникающую способность терапевтических антител, но не должны изменять уровень соответствующих рецепторов. Понижающая регуляция рецепторов-мишеней может влиять на их роль в головном мозге, вызывая побочные эффекты.

Анализировали, влияет ли многократное введение антитела против IGF1R по настоящему изобретению на уровни IGF1R в головном мозге. Согласно Примеру 14-6, мышам со смоделированной болезнью Паркинсона проводили многократное введение биспецифичного антитела в бивалентной форме, где клон 1564 был связан с терапевтическим антителом для лечения болезни Паркинсона, терапевтического антитела для лечения болезни Паркинсона самого по себе и IgG отрицательного контроля один раз в неделю на протяжении 3 месяцев и затем уровни IGF1R в ткани головного мозга анализировали вестерн-блоттингом.

После перфузии ткани головного мозга трех мышей в каждой группе с использованием PBS и ее гомогенизации 10 мкг лизата вносили в 4-12% бис-трис-гель, проводили электрофорез и перенос на PVDF-мембрану. В остальном метод был таким же, как в Примере 19-1.

Результаты эксперимента показаны на Фиг. 15b. Биспецифичное антитело, в состав которого входил клон 1564, продемонстрировало уровень IGF1R, сходный с группами введения терапевтического антитела для лечения болезни Паркинсона самого по себе и IgG. Эти результаты показывают, что клон 1564 не приводит к серьезным изменениям уровня IGF1R в головном мозге даже после его многократного введения, и поэтому ожидается, что у данного антитела будет мало побочных эффектов при его использовании в качестве переносчика через ГЭБ.

19-3: Анализ распределения антитела в головном мозге после введения антитела против

IGF1R

Переносчик через ГЭБ связывается с рецептором на поверхности клетки эндотелия головного мозга и доставляет терапевтическое антитело в головной мозг, но с рецептором на поверхности нормальной клетки головного мозга должно связываться небольшое количество антитела. Если с нормальными клетками, экспрессирующими антиген в головном мозге, будет связываться большое количество переносчика через ГЭБ, до мишени будет доходить небольшое количество терапевтического антитела, связанного с переносчиком.

Для анализа распределения антитела против IGF1R по настоящему изобретению в головном мозге распределение антитела против IGF1R анализировали иммунным окрашиванием головного мозга животных, использованных в *in vivo* эксперименте, проведенном в Примере 21-2. Крыс SD, которым вводили бивалентную форму клона 1564, перфузировали физиологическим раствором посредством

транскардиальной перфузии. Левое полушарие фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине на протяжении 24 часов. Головной мозг промывали с использованием 1X PBS и замораживали на 24 часа в растворе, содержащем 30% сахарозы. Головной мозг замораживали в OCT и хранили при -80°C до приготовления срезов. Получали фронтальные срезы толщиной 25 мкм и помещали их в 1x PBS, содержащий 0,1% азид натрия, в 24-луночной чашке Петри. Ткани блокировали и пермеабелизировали инкубацией с бессывороточным белковым блоком Dako (X0909, DAKO), содержащим 0,3% Tween-20, в свободном режиме при комнатной температуре на протяжении 1 часа. Первичное антитело обрабатывали биотинилированным антителом к человеческому Fc (BA3080, Vector Labs) в отношении 1:50 и инкубировали в течение ночи при 4°C . После трехкратной промывки с использованием TBS антитело против клеток эндотелия обрабатывали RECA-1 (ab9774, AbCam) в отношении 1:2000 или антителом к нейронам NeuN (MAB377, Millipore) в отношении 1:250 на протяжении 2 часов. После промывки проводили связывание с Alexa488 и обработку вторичным антителом для каждого антитела на протяжении 45 минут. После промывки срезы помещали на предметное стекло и окрашивали ядра, добавляя среду для заключения флуоресцентных микропрепаратов ProLong Gold, содержащую DAPI, или Dako, содержащую Hoechst 33258. Кору головного мозга и гиппокамп анализировали на конфокальном микроскопе при подходящей длине волны флуоресценции. Результаты анализа показаны на Фиг. 15с.

Полученные результаты показывают, что биспецифичное антитело, связанное с клоном 1564, не связывалось с нормальными нейронами, но специфично связывалось с клетками эндотелия головного мозга. Поэтому ожидается, что у антитела против IGF1R по настоящему изобретению будет мало побочных эффектов благодаря тому, что оно лишь увеличивает способность терапевтического антитела к проникновению через ГЭБ без связывания с нормальными клетками головного мозга, и будет приводить к повышению терапевтической эффективности терапевтического антитела.

Пример 20. Анализ способности антитела против IGF1R к проникновению через ГЭБ *in vitro*

20-1. Анализ способности бивалентного антитела к проникновению через ГЭБ в модели ГЭБ, имеющей происхождение от sv-ARBEC

Антитела, полученные в Примерах 11 и 12, использовали для получения биспецифичного антитела в Примере 14-2 и затем анализировали способность

полученного биспецифичного антитела к проникновению через ГЭБ *in vitro* в модели ГЭБ на основе sv-ARBEC. sv-ARBEC высевали одним слоем на проницаемую мембрану и целостность ГЭБ-системы оценивали заранее, исходя из сопротивления (TEER) и степени прохождения сахарозы через ГЭБ-систему. При этом sv-ARBEC обрабатывали культуральной средой для астроцитов крысы (RAS-CM), которая, как известно, способствует обеспечению целостности такой системы. Через 90 минут после нанесения анализируемых антител 1564, 48G5, 54H4, 60H6 и B11 в форме биспецифичных антител на мембрану количество антител в нижней камере анализировали масс-спектрометром. Для масс-спектрометрии анализировали и затем использовали сигнатурные пептиды из Fc и scFv каждого антитела. При этом в качестве отрицательных контролей использовали терапевтическое антитело для лечения болезни Паркинсона (11F11) само по себе и биспецифичное антитело, где с этим терапевтическим антителом была связана scFv-форма биоаналога Герцептина™. Калибровочные пределы системы определяли, пропуская антитело A20.1 (полученное Национальным научно-исследовательским советом), которое, как известно, не проникает через ГЭБ. Значения, полученные при масс-спектрометрии, заносили в формулы, известные из ранее опубликованной литературы, получая Papp-значение, которое отражало степень способности к проникновению через ГЭБ *in vitro*.

Результаты анализа показаны на Фиг. 16а. Проанализированные антитела, за исключением B11, продемонстрировали более высокую способность к проникновению через ГЭБ, чем отрицательный контроль. В частности, клон 1564 продемонстрировал более высокую способность к проникновению через ГЭБ, чем остальные клоны. Эти результаты показывают, что клоны 1564, 48G5, 54H4, 60H6 и биспецифичные антитела, связанные с клонами 1564, 48G5, 54H4, 60H6, могут иметь более высокую способность к проникновению через ГЭБ *in vivo*, чем одиночное антитело.

20-2. Анализ способности моновалентного антитела к проникновению через ГЭБ в модели ГЭБ, имеющей происхождение от sv-ARBEC

В такой же модели, как в Примере 20-1, анализировали способность моновалентных, полученных согласно Примеру 14-4, и бивалентных антител, полученных согласно Примеру 14-2, к проникновению через ГЭБ *in vitro*. Бивалентное антитело и моновалентное антитело, полученные с использованием клона 1564, и терапевтическое антитело для лечения болезни Паркинсона (3A9) в качестве отрицательного контроля пропускали через sv-ARBEC ГЭБ-систему и затем

анализировали количество прошедших через нее антител. Результаты анализа показаны на Фиг. 16b.

Бивалентная форма и моновалентная форма клона 1564 продемонстрировали более высокую способность к проникновению через ГЭБ *in vitro*, чем антитело 3A9 само по себе, и, в частности, способность бивалентной формы к проникновению через ГЭБ была выше, чем у моновалентной формы. Эти результаты показывают, что клон 1564 может усиливать способность терапевтических антител, связанных с ним в различных формах, к проникновению через ГЭБ *in vitro*.

20-3. Анализ способности антитела против IGF1R к проникновению через ГЭБ в модели ГЭБ, имеющей происхождение от человеческих iPSC

Модель ГЭБ, имеющая происхождение от человеческих стволовых клеток, демонстрирует более высокое сопротивление (TEER), чем ГЭБ-системы, имеющие происхождение от клеток крысы или мыши, и экспрессирует все из различных маркеров, обнаруженных в ГЭБ. Поэтому проницаемость ГЭБ в модели, имеющей происхождение от человеческих стволовых клеток, ниже, чем у ГЭБ, имеющего происхождение от клеток животных, и данная модель хорошо воспроизводит ГЭБ человека.

Векторы, такие как эписомные векторы *oriP/EBNA1*, кодирующие OCT4, SOX2, *c-Myc*, KLF4, NANOG и LIN28, вводили в клетки, имеющие происхождение от человеческой амниотической жидкости (AF-iPSC), и репрограммированные на iPSC. Полученные колонии обрабатывали KO DMEM/F12, KOSR, glutamax, NEAA и бета-меркаптоэтанолом с получением клеток эндотелия в предифференцированном состоянии и затем обрабатывали бессывороточной дифференцировочной средой для эндотелия, 1% PDS и 20 нг/мл bFGF для дифференцировки с получением клеток эндотелия головного мозга. Забор клеток амниотической жидкости и подготовка ГЭБ-системы с использованием этих клеток были проведены Национальным научно-исследовательским советом. После подтверждения целостности системы по показателю сопротивления и показателю прохождения сахарозы антитело против IGF1R анализировали на предмет его способности к проникновению через ГЭБ в форме биспецифичного антитела в виде комбинации терапевтического антитела для лечения болезни Паркинсона с scFv-формой антитела против IGF1R. Анализируемые антитела представляли собой бивалентную форму клона 1564, моновалентную форму клона 1564, бивалентную форму клона F06 и бивалентную форму клона C04. В

качестве отрицательного контроля использовали терапевтическое антитело 11F11 для лечения болезни Паркинсона. Антитела, прошедшие через ГЭБ-систему анализировали таким же образом, как в Примере 20-1.

Результаты анализа показаны на Фиг. 16с. Все проанализированные клоны продемонстрировали более высокую способность к проникновению через ГЭБ, чем группа отрицательного контроля. В частности, бивалентное F06 и бивалентное C04 продемонстрировали способность к проникновению через ГЭБ, до 15 раз выше, чем у одиночного антитела. Полученные результаты показывают, что антитела против IGF1R по настоящему изобретению эффективно проходят через ГЭБ-систему человеческого происхождения по сравнению с одиночным антителом.

Пример 21. Анализ способности антитела против IGF1R к проникновению через ГЭБ *in vivo* (анализ колокализации)

21-1. Колокализация минител с сосудами головного мозга

Для подтверждения распределения антител против IGF1R по настоящему изобретению по сосудам головного мозга *in vivo* проводили следующий эксперимент.

Конкретно, PBS-буфер или 10 мг/кг контрольного IgG и минител клонов 996, 1226 и 1564, полученных в Примере 14-1, вводили в хвостовую вену самцов мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель, соответственно. Через 4 часа проводили интракардиальную перфузию головного мозга мыши достаточным количеством 0,9% раствора NaCl и 4% параформальдегида. Выделяли фиксированный головной мозг, приготавливали срезы толщиной 20 мкм и проводили одновременное окрашивание антителом против мышинового CD31 как сосудистого маркера и антителом против человеческого Fc для подтверждения колокализации сосудов головного мозга и анализируемого IGF1R. Для визуализации CD31 и человеческого Fc под флуоресцентным микроскопом использовали вторичное антитело, конъюгированное с Alexa 488, для CD31, вторичное антитело, конъюгированное с Alexa 594, для человеческого Fc.

Результаты эксперимента показаны на Фиг. 17а.

По результатам эксперимента было подтверждено, что антитела по настоящему изобретению, не блокирующие связывание с лигандом, обладали отличной способностью к проникновению через ГЭБ. В результате окрашивания тканей головного мозга сосудистыми маркерами (антитело против CD31, верхний ряд) и человеческими антителами (антитело против человеческого Fc, нижний ряд) методом

анализа степени колокализации антитела с кровеносными сосудами головного мозга посредством иммунного окрашивания (Neuron (2016) Yu-Zuchero et al.) антитела по настоящему изобретению, не блокирующие связывание с лигандом, продемонстрировали более высокую степень колокализации, чем IgG контрольной группы.

21-2. Анализ способности биспецифичного антитела к проникновению через ГЭБ

in vivo

Была предпринята попытка подтвердить способность антитела против IGF1R по настоящему изобретению к проникновению через ГЭБ *in vivo* у нормальных крыс. PBS-буфер или 10 мг/кг контрольного IgG и терапевтическое антитело для лечения болезни Паркинсона (11F11) или бивалентное биспецифичное антитело (11F11-1564), содержащее клон 1564, связанный с терапевтическим антителом, вводили в хвостовую вену крыс SD, соответственно. Через 24 часа количество антител в СМЖ и головном мозге анализировали масс-спектрометрией. Масс-спектрометрию проводили тем же методом, что в Примере 20-1.

Биспецифичное антитело, с которым был связан клон 1564, продемонстрировало более высокую способность к проникновению в СМЖ и головной мозг, чем терапевтическое антитело без антитела против IGF1R, и его эффективность была подтверждена как при дозе 10 мг/кг, так и при дозе 30 мг/кг. При дозе 30 мг/кг биспецифичное антитело продемонстрировало способность к проникновению в головной мозг, приблизительно до 4,5 раз превосходящую соответствующую способность одиночного антитела.

Клон 1564 получали в бивалентной форме и моновалентной форме согласно Примерам 14-2 и 14-4, и затем вводили в дозе 30 мг/кг или 60 мг/кг таким же образом, как описано выше, и через 24 часа анализировали количество антител в СМЖ и головном мозге. Эти два типа биспецифичных антител, связанных с клоном 1564, продемонстрировали более высокую способность к проникновению в СМЖ и головной мозг, чем одиночные антитела. В частности, бивалентная форма продемонстрировала способность к проникновению через ГЭБ в головной мозг, до 5 раз более высокую, чем моновалентная форма.

Результаты, представленные на ФИГ. 17b, демонстрируют, что клон 1564 повышает способность терапевтического антитела к проникновению через ГЭБ в организме даже при связывании с терапевтическим антителом в различных формах.

Ожидалось, что аффинные варианты клона 1564, полученные согласно Примеру 2, будут улучшать ФК в сыворотке по сравнению с исходным клоном. Таким образом, ожидалось, что способность к проникновению через ГЭБ будет улучшена благодаря более продолжительному присутствию антитела в сыворотке и постоянному поддержанию входящего потока через ГЭБ. Через 0, 24 и 48 часов после внутривенного введения аффинных вариантов, полученных в бивалентной форме согласно Примеру 14-2 или в моновалентной форме согласно Примеру 14-4, крысам SD в дозе 30 мг/кг проводили забор крови из глазной вены. Анализируемые антитела разделяли на два эксперимента в соответствии с остоном терапевтического антитела. Биспецифичные антитела соответствующих вариантов, использованные в эксперименте, показаны в Таблице 26 ниже.

[Таблица 26] Биспецифические антитела, используемые для *in vivo* анализа ГЭБ-проникающей способности

Клоны с химерным остовом	Клоны с гуманизированным остовом
Бивалентное Ch11f11-1564	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-1564
Моновалентное Ch11f11-1564	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH5
Моновалентное Ch11f11-C04	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH16
Бивалентное Ch11f11-F06	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH35
Моновалентное Ch11f11-F0f	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH9
**	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH2
**	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH7
**	Бивалентное Hu11f11(ver.2)-VH32

Уровни антител в крови анализировали посредством ELISA. После сорбции козьего антитела против человеческого Fc на 96-луночный планшет, вносили подходящее количество разведенного образца и затем проводили выявление антителом против человеческого Fab, конъюгированного с HRP. Результаты анализа показаны на Фиг. 17d.

В результате, в первой анализируемой группе моновалентная форма 1564, моновалентная форма F06 и моновалентная форма C04 продемонстрировали более продолжительную ФК в сыворотке, чем бивалентная форма исходного клона 1564. Во второй анализируемой группе бивалентные формы VH2, VH5, VH7, VH9, VH16 и VH32, за исключением VH35, продемонстрировали лучшую ФК в сыворотке по сравнению с бивалентной формой 1564.

Для анализа способности к проникновению через ГЭБ в этих группах через 48 часов у крыс проводили забор СМЖ и анализировали ее тем же методом ELISA. Результаты анализа показаны на Фиг. 17е.

В первой анализируемой группе моновалентная форма 1564, моновалентная форма F06 и моновалентная форма C04, продемонстрировавшие лучшую ФК в сыворотке, продемонстрировали более высокие уровни антител в СМЖ по сравнению с бивалентной формой исходного 1564. Во второй анализируемой группе бивалентные формы VH2, VH5, VH7, VH9, VH16 и VH32, также продемонстрировавшие лучшую ФК в сыворотке, продемонстрировали более высокие уровни антител в СМЖ по сравнению с бивалентной формой исходного 1564. VH35 продемонстрировал менее продолжительную ФК в сыворотке и низкий уровень антитела в СМЖ по сравнению с бивалентной формой исходного 1564.

Результаты, представленные на ФИГ. 17d и 17e, показывают, что ФК в сыворотке является важным фактором для способности антитела к проникновению через ГЭБ благодаря непрерывному входящему потоку антитела через ГЭБ и что биспецифичные антитела, имеющие переносчик через ГЭБ и лучшую ФК в сыворотке, имеют более высокую способность к проникновению через ГЭБ. В частности, в случае моновалентной формы F06 с максимальным уровнем антитела в СМЖ ее способность к проникновению через ГЭБ была приблизительно в 5 раз выше, чем у бивалентной формы исходного 1564. В Примерах 18-2 и 18-3, поскольку способность бивалентного антитела 1564 к проникновению в СМЖ была приблизительно в 3 раза выше, чем у одиночного антитела, ожидалось, что способность моновалентной формы F06 к проникновению через ГЭБ будет приблизительно до 15 раз выше, чем у одиночного антитела.

Пример 22. Дезамидирование антитела к IGF1R

Реакция дезамидирования обозначает, например, атаку пептидной связи между двумя сторонами аспарагина с образованием симметричного сукцинимидного промежуточного продукта, который, в результате гидролиза, трансформируется в аспарагиновую кислоту или изоаспарагиновую кислоту. Поскольку реакция дезамидирования может влиять на непрерывную активность белка, проводили замену одних аминокислот легкой цепи и тяжелой цепи на другие аминокислоты для предотвращения дезамидирования и для обеспечения долгосрочной стабильности.

Для подтверждения сайта дезамидирования, определенного компьютерным анализом, антитело 1564 к IGF1R оставляли при 40°C и оценивали степень дезамидирования. В результате, было подтверждено, что от 4,6 до 47,3% реакций дезамидирования происходят в CDR2 и CDR3 легкой цепи и CDR2 тяжелой цепи, как показано на ФИГ. 18а. Для предотвращения дезамидирования проводили замену аминокислот в каждом сайте, как показано на ФИГ. 18b, и анализировали изменения способности к связыванию с белком IGF1R в зависимости от каждой аминокислотной замены. Отбирали мутанты, демонстрирующие такую же аффинность связывания, как 1564 дикого типа, и было подтверждено, что способность этих мутантов, имевших по 3 или 4 мутации, была такой же, как у 1564 дикого типа. Введение этих мутаций означает, что состав буфера и условия хранения позволяют длительное время поддерживать аффинность связывания и стабильную форму. Результаты анализа показаны в Таблице 27.

[Таблица 27]

Экспериментальная классификация	Клон антитела	EC ₅₀ (нМ)	Значение насыщения
Первый	1564(WT)	2,15	1,1
	N95aH	2,63	1,08
	N95aR	2,3	1,17
	N95aK	2,07	1,18
Второй	1564(WT)	2,66	0,977
	N95aD	2,07	0,896
	N54D	2,89	0,933
	N54Q	2,2	0,885
Третий	1564(WT)	6,87	0,863
	N51D	7,35	0,932

Пример 23. Картирование эпитопов антител против IGF1R

23-1. ELISA-анализ антитела против IGF1R, термически обработанного белка IGF1R и нативного белка IGF1R

В данном примере была предпринята попытка определить какой эпитоп распознает антитело против IGF1R: линейный или конформационный. ELISA проводили с использованием бивалентных биспецифичных антител 1564, 48G5, 54H4, 60H6 и B11 и белка ECD нативного человеческого IGF1R или прогретого белка

(термически обработанного IGF1R). ELISA проводили так же, как показано в Примере 15. Результаты анализа показаны в Таблице 28.

[Таблица 28]

Название клона	EC ₅₀ (нМ) в отношении нативного IGF1R	EC ₅₀ в отношении термически обработанного IGF1R (нМ)
ch11F11-1564	0,914	N/A*
ch11F11-48G5	1,21	N/A
ch11F11-54H4	2,88	N/A
ch11F11-60H6	10	N/A
ch11F11-B11	7,13	410

*N/A — недоступно

Клоны продемонстрировали связывание с белком ECD нативного человеческого IGF1R, сходное с отмеченным в Примере 15, но не связывались с белком ECD термически обработанного человеческого IGF1R, третичная структура которого была разрушена нагреванием. Это означает, что антитело против IGF1R по настоящему изобретению связывается с конформационным эпитопом, но не с линейным эпитопом.

23-2. Картирование эпитопов антитела против IGF1R

Для анализа конформационного эпитопа клона 1564 проводили аланиновое сканирование, как описано ниже. Клетки OGFAR3, являющиеся линией клеток рака яичника с подтвержденной низкой экспрессией IGF1R, модифицировали для экспрессии библиотеки IGF1R, где с N-концом была слита метка eGFP, а C-концевой киназный домен был удален. Библиотека IGF1R содержит мутации, где остатки, расположенные на поверхности IGF1R, заменены аланином. Полученной библиотекой трансфицировали клетки OVCAR3. Клетки, в которых была определена экспрессия IGF1R, обрабатывали антителом 1564 и затем проводили их флуоресцентное мечение обработкой вторичным антителом, меченным DyLight650. Меченные клетки классифицировали по наличию или отсутствию экспрессии IGF1R, экспрессии IGF1R и наличию или отсутствию связывания с 1564 и проводили глубокое секвенирование РНК с применением методики Illumina HiSeq для анализа частоты каждой аланиновой мутации в соответствующей группе клеток. Соответствующую частоту нормализовали по результату, полученному для клеток, экспрессировавших IGF1R дикого типа, и затем рассчитывали относительную частоту для отбора тех мутаций, число которых уменьшалось в группе клеток, меченных 1564. Исходя из этих наблюдений, было

обнаружено, что эпитоп клона 1564 был расположен в домене FN2, а принадлежащие к нему остатки представляли собой Y775, P776, F778, R650, S791 и L798. Полученные результаты и последовательности, распознаваемые клоном 1564, показаны на ФИГ. 19. С учетом отсутствия данных об участии этих остатков в связывании с IGF1 в опубликованной ранее литературе эти результаты правдоподобно описывают свойства клона 1564, использованного в Примере 23-1.

Пример 24. Сравнение аффинности связывания одиночного антитела и биспецифичного антитела с антигеном

24-1: Аффинность связывания одиночного антитела и биспецифичного антитела с антигеном альфа-синуклеина

Когда scFv-форма антитела к IGF1R была связана с антителом типа IgG к альфа-синуклеину, анализировали влияние такого связывания на аффинность связывания антитела к альфа-синуклеину.

Агрегаты альфа-синуклеина сорбировали на 96-луночный планшет в концентрации 1 мкг/мл на протяжении 18 часов и после промывки проводили обработку каждым антителом в 5-кратном разведении, начиная с 400 нМ. Связанные антитела связывали с антителом против человеческого Fc с HRP и затем проводили окрашивание раствором ТМВ, измеряя степень связывания антител.

Как показано на Фиг. 20а, было подтверждено, что аффинность связывания одиночного антитела и биспецифичного антитела с агрегатами альфа-синуклеина была одинаковой.

24-2: Аффинность связывания одиночного антитела и биспецифичного антитела с антигеном IGF1R

Для сравнения степени связывания одиночного антитела к альфа-синуклеину и биспецифичного антитела с антигеном IGF1R проводили эксперимент таким же образом, как в Примере 22.

Как показано на Фиг. 20b, было подтверждено хорошее зависимое от концентрации связывание биспецифичного антитела, имевшего scFv-форму антитела против IGF1R, однако одиночное антитело без области антитела к IGF1R не продемонстрировало связывания.

24-3: Анализ связывающей способности гуманизированного антитела к альфа-синуклеину

Разницу в аффинности связывания биспецифичного химерного антитела и биспецифичного гуманизированного антитела анализировали, проводя эксперимент таким же образом, как в Примере 24-1.

Как показано на ФИГ. 20с, биспецифичные гуманизированные антитела имели аффинность связывания с агрегатами альфа-синуклеина на уровне, сходном с биспецифичным химерным антителом, и было подтверждено, что моновалентное биспецифичное антитело с одним scFv к IGF1R также демонстрировало аффинность связывания на уровне, сходном с химерными антителами.

По результатам анализа аффинности связывания биспецифичного химерного антитела и биспецифичного гуманизированного антитела с IGF1R посредством проведения эксперимента таким же образом, как в Примере 24-2, все биспецифичные антитела продемонстрировали одинаковую аффинность связывания, однако одиночное антитело без scFv к IGF1R не продемонстрировало связывания, как показано на ФИГ. 20d.

Эти результаты показывают, что при гуманизации антитела с заменой области мышиного антитела, действующей в организме человека как иммуноген, антитело имеет такую же активность без изменения аффинности связывания с агрегатами альфа-синуклеина и IGF1R.

24-4: Сравнение фагоцитоза при использовании одиночного антитела и биспецифичного антитела

Фагоцитоз относится к активности по удалению внеклеточных веществ при участии различных рецепторов макрофагов. Различные белковые агрегаты индуцируют иммунный ответ или воспалительную реакцию, что оказывает неблагоприятное влияние на организм человека. В частности, известно, что при введении антитела для удаления агрегатов альфа-синуклеина он опосредован взаимодействием Fc-области антитела и FcR на поверхности клеток. По этой причине проводили сравнение фагоцитарной активности при использовании одиночного антитела и биспецифичного антитела, связанного с scFv к IGF1R.

Для сравнения фагоцитоза при использовании одиночного антитела и биспецифичного антитела использовали микроглиальные клетки BV-2 мышинового происхождения. Клетки BV-2 культивировали в среде RPMI1640, получали в

концентрации 2×10^6 клеток/мл и вносили в количестве 100 мкл в 96-луночные планшеты с U-образным дном. 10 мкг/мл агрегатов альфа-синуклеина и 25 мкг/мл антител разводили в среде RPMI1640, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 20 минут. Клетки BV-2 обрабатывали смесью агрегатов альфа-синуклеина и антител и оставляли на 15 минут. Агрегаты альфа-синуклеина удаляли из супернатанта центрифугированием при 1200 об/мин и проводили трехкратную промывку PBS-буфером (pH 2,5) для удаления агрегатов или антител, связанных с поверхностью клеток. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом и промывали PBS-буфером. Для подтверждения фагоцитоза агрегатов и антител клетками добавляли 0,5% Triton X-100 для разрушения клеточных мембран, проводили промывку PBS-буфером и обработку антителом против всех форм альфа-синуклеина на протяжении 1 часа. Связанное антитело против всех форм альфа-синуклеина обрабатывали противокроличьим антителом с Alexa 488 на протяжении 1 часа и затем проникновение агрегатов в макрофагальные клетки подтверждали FACS-анализом.

Как показано на ФИГ. 20е, было подтверждено, что нормальный человеческий IgG не влиял на макрофаги, а при обработке антителом к альфа-синуклеину фагоцитоз агрегатов альфа-синуклеина был усилен. При сравнении одиночного антитела и биспецифичного антитела были подтверждены сходный уровень фагоцитоза и отсутствие влияния scFv-формы антитела к IGF1R, связанной с C-концом IgG, на активность антитела к альфа-синуклеину.

Пример 25. Оценка эффективности биспецифичного антитела

В соответствии с Примером 14-6 получали бивалентное биспецифичное антитело, содержащее химерное антитело 11F11 и scFv клона 1564, и полученное биспецифичное антитело и одиночное антитело к альфа-синуклеину анализировали на предмет их эффективности *in vivo* у трансгенных мышей, сверхэкспрессировавших человеческий альфа-синуклеин (mThy-1, человеческий α -синуклеин, Калифорнийский университет в Сан-Диего). 2,5 мг/кг одиночного антитела или человеческого IgG или то же молярное количество бивалентных биспецифичных антител вводили внутривенно один раз в неделю на протяжении 3 месяцев. Использовали по пять мышей на группу и в качестве контроля использовали нетрансгенных животных из того же помета. Затем проводили перфузию следующим образом.

По завершении последнего введения животных анестезировали хлоралгидратом в соответствии с требованиями по гуманному обращению с животными и затем

проводили перфузию 0,9% физиологическим раствором для анализа патологических изменений в головном мозге. Затем одну половину (сагиттальный срез) перфузированного головного мозга хранили в 4% параформальдегиде (pH 7,4, 4°C) в фосфатном буфере до момента анализа, а другую половину сразу замораживали (-70°C).

Патоморфологический анализ проводили следующим образом. Из половины головного мозга, фиксированной в параформальдегиде, получали непрерывные срезы толщиной 40 мкм методом свободноплавающих срезов с использованием виброметра. Для подтверждения уровня экспрессии альфа-синуклеина в головном мозге в каждой группе введения срезы, включавшие кору, гиппокамп и полосатое тело, инкубировали с антителами против альфа-синуклеина (антитело к p129 α -syn, маркер агрегатов, Abcam, ab59264, или антитела к полноразмерному альфа-синуклеину) при 4°C в течение ночи. Альтернативно, срезы анализировали на предмет GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок) (AB5804, Millipore) для анализа степени активности астроцитов или инкубировали с антителом к IL-1 β (ab9722, Abcam) для анализа степени нейровоспаления, соответственно. Альтернативно, проводили обработку антителом против NeuN (Chemicon, #MAB377) для анализа степени гибели нейронов в гиппокампе. После инкубации с первичным антителом проводили обработку козым антителом против кроличьего IgG, связанным с биотином (1:100, Vector Laboratories), и авидином D с пероксидазой хрена (1:200, ABC Elite, Vector Laboratories) и выявление диаминобензидином (DAB). Проводили микроскопию каждого иммуногистохимически окрашенного среза в светлом поле, измеряя оптическую плотность. Полученные результаты показаны на ФИГ. 21a-21e.

25-1. Анализ способности химерного антитела и биспецифичного антитела к уменьшению количества альфа-синуклеина

На ФИГ. 21a показаны результаты окрашивания и оценки коры и гиппокампа в ткани головного мозга мышей с использованием антитела к p-129 α -Syn после введения мышам антител для оценки способности химерного антитела 11F11 и бивалентного биспецифичного антитела, содержащего клон 1564 и химерное антитело 11F11, к устранению агрегатов альфа-синуклеина в модели на (трансгенных) мышах, сверхэкспрессирующих человеческий альфа-синуклеин. p-129 α -syn представляет собой форму, фосфорилированную по 129-му остатку, являясь маркером агрегатов, и представлен темно-коричневыми пятнами или агрегатами в окрашенной ткани.

Согласно ФИГ. 21a, группа введения IgG продемонстрировала более высокую степень окрашивания p-129 α -syn, чем нетрансгенная контрольная группа (# — однофакторный ANOVA, $p < 0.01$). В противоположность этому, в группе введения одиночных антител или биспецифичных антител степень окрашивания p-129 α -syn или агрегатов была существенно снижена. В частности, в гиппокампе степень этого снижения в группе введения биспецифичных антител была больше, чем в группе химерного антитела 11F11 (* — однофакторный ANOVA, $p < 0.05$). На ФИГ. 21b показаны результаты такого же эксперимента, как на ФИГ. 21a, за исключением окрашивания антителом к полноразмерному альфа-синуклеину в качестве маркера. Выявление всего альфа-синуклеина указывает на то, что антитело по настоящему изобретению обладает способностью к устранению альфа-синуклеина самого по себе и ингибировать его передачу от клетки к клетке. В других аспектах это можно также интерпретировать как ингибирование образования агрегатов из мономеров или удаление всех мономеров. Введение одиночных антител и биспецифичных антител уменьшает степень повышения человеческого альфа-синуклеина у трансгенных мышей по сравнению с группой введения IgG. В частности, в гиппокампе биспецифичные антитела были эффективнее одиночных антител.

Полученные результаты показывают, что химерное антитело 11F11 и биспецифичное антитело эффективно снижают уровни альфа-синуклеина и его агрегатов в моделях болезни Паркинсона на животных даже в низкой дозе 2,5 мг/кг. В частности, биспецифичное антитело превосходит одиночное антитело, позволяя предположить, что биспецифичное антитело может достигать головного мозга в большем количестве, чем одиночное антитело, и обеспечивать более эффективное лечение заболевания, благодаря большей способности к проникновению через ГЭБ.

25-2. Анализ способности химерного антитела и специфичного антитела к уменьшению астроглиоза и снижению уровня воспалительных цитокинов

Глиоз является неспецифической реакцией, которая возникает в глиальных клетках в ответ на повреждение центральной нервной системы и запускается повреждением ГЭБ или такими веществами, как TGF-бета и интерлейкин. В типичных случаях он включает астроглиоз, и в качестве его маркера используют белок GFAP. Поэтому анализировали эффект уменьшения астроцитоза и высвобождения воспалительных цитокинов, запускающих астроцитоз, при введении химерного

антитела 11F11 и биспецифичного антитела, содержащего клон 1564 и указанное химерное антитело. Результаты анализа показаны на ФИГ. 21c и ФИГ. 21d.

На ФИГ. 21c показаны результаты окрашивания и оценки ткани головного мозга мышей с использованием GFAP (астроглиоз) в качестве маркера после введения антител для оценки способности химерного антитела 11F11 и биспецифичного антитела, содержащего клон 1564 и указанное химерное антитело, полученных в одном примере настоящего изобретения, к уменьшению астроглиоза *in vivo*. Одиночное антитело и биспецифичное антитело ингибировали астроглиоз по сравнению с контрольной группой IgG. В частности, было подтверждено, что в полосатом теле эффективность биспецифичного антитела была выше эффективности одиночного антитела.

На ФИГ. 21d показаны результаты окрашивания и оценки ткани головного мозга мышей с использованием антитела к IL-1-бета в качестве маркера после введения антител для оценки способности химерного антитела 11F11 и биспецифичного антитела, содержащего клон 1564 и указанное химерное антитело, полученных в одном примере настоящего изобретения, к снижению воспалительных цитокинов *in vivo*. IL-1-бета вызывает воспаление, приводя к гибели и воспалительному ответу различных нейронов. В гиппокампе крыс, которым вводили антитела по настоящему изобретению, IL-1-бета был снижен в группах введения одиночных антител и биспецифичных антител по сравнению с контрольной группой IgG, и, в частности, у биспецифичного антитела способность к такому снижению была значительно выше, чем у одиночного антитела (## — однофакторный ANOVA, $p < 0.005$; * — однофакторный ANOVA, $p < 0.05$).

Как показано в графических материалах, было продемонстрировано, что антитело по настоящему изобретению уменьшает астроглиоз и высвобождение воспалительного цитокина IL-1-бета, запускающего астроглиоз, по сравнению с контролем.

25-3. Анализ способности химерного антитела и биспецифичного антитела к уменьшению нейродегенерации

В опубликованной ранее литературе подтверждено, что гибель клеток головного мозга происходит из-за нейротоксичности и воспалительного ответа на альфа-синуклеин. Анализировали способность одиночных антител и биспецифичных

антител по настоящему изобретению к ингибированию гибели клеток головного мозга, вызванной альфа-синуклеином, *in vivo*.

В результате окрашивания NeuN, являющимся маркером нейронов коры и гиппокампа, было обнаружено, что как одиночное антитело, так и биспецифичное антитело снижали степень гибели клеток головного мозга по сравнению с контрольной группой IgG. В частности, было подтверждено, что в коре биспецифичное антитело обладало большей способностью к ингибированию гибели клеток головного мозга, чем одиночное антитело. Полученные результаты показаны на Фиг. 21е.

Пример 26. Увеличение периода полувыведения конструированием Fc и повышению способности к проникновению через ГЭБ благодаря увеличенному периоду полувыведения

FcRn является важным рецептором на мембране клеток, который увеличивает период полувыведения, улавливая и направляя антитело внутрь клеток, ингибируя распад антитела, происходящий во время его циркуляции в кровеносных сосудах. Способность к проникновению через ГЭБ также важна для транцитозной активности антитела, но хорошо известно, что транцитозная активность антитела важна при его способности к проникновению через ГЭБ, однако антитела проходят через ГЭБ в зависимости от концентрации антител в кровеносных сосудах. По этой причине для увеличения периода полувыведения биспецифичного антитела получали биспецифичные антитела, повышая аффинность связывания с FcRn заменой метионина (Met) на лейцин (Leu) в 428-м аминокислотном положении Fc-области. В результате сравнения периода полувыведения при введении биспецифичного антитела дикого типа и биспецифичного антитела M428L в концентрации 10 мг/кг трансгенным мышам, экспрессировавшим человеческий FcRn, было подтверждено увеличение периода полувыведения приблизительно на 50%, как показано на ФИГ. 22. Для подтверждения увеличения периода полувыведения анализировали ФК-профили при введении биспецифичного антитела дикого типа, бивалентного биспецифичного антитела M428L и моновалентного биспецифичного антитела M428L обезьянам. В случае биспецифичного антитела дикого типа, как показано на ФИГ. 22а, его концентрация в крови быстро снижалась после 168 часов, в то время как биспецифичные антитела M428L с высокой аффинностью связывания с FcRn сохраняли более высокую концентрацию в крови по сравнению с диким типом. Было подтверждено, что у биспецифичного антитела M428L период полувыведения был

приблизительно на 1,5 суток больше, чем у биспецифичного антитела дикого типа. В частности, применительно к клиренсу, наилучший клиренс имело моновалентное биспецифичное антитело M428L, а биспецифичное антитело дикого типа продемонстрировало самый быстрый клиренс (Фиг. 22b).

Для подтверждения улучшенного прохождения через ГЭБ благодаря эффекту увеличения периода полувыведения через 24 часа после введения антител проводили забор СМЖ и анализировали количество антител в СМЖ. После сорбции 100 нг/мл IGF1R в охлажденном состоянии на протяжении 18 часов вносили СМЖ, выявляя антитела, связывавшиеся с IGF1R. Как видно на ФИГ. 22с, были подтверждены прохождение большого количества биспецифичных антител, присутствовавших в большом количестве в крови, через ГЭБ и отличная способность моновалентного биспецифичного антитела M428L к проникновению через ГЭБ, более высокая по сравнению с бивалентным биспецифичным антителом M428L.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

для региональной стадии

1. Антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где

(а) VH содержит

CDR1 тяжелой цепи (H-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:1-9,

H-CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:10-49, и

H-CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:50-80, и

(б) VL содержит

CDR1 легкой цепи (L-CDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:96-113,

L CDR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:114-132, и

L CDR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:133-161.

2. Антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1,

где VH содержит одно или более из

каркасной области 1 тяжелой цепи (H-FR1), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:81-84,

H-FR2, содержащую SEQ ID NO: 85 или 86,

H-FR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:87-91, и

H-FR4, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:92-95.

3. Антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п. 1 или 2, где VL содержит одно или более из:

каркасной области 1 легкой цепи (L-FR1), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:162-164,

L-FR2, содержащую SEQ ID NO:165,

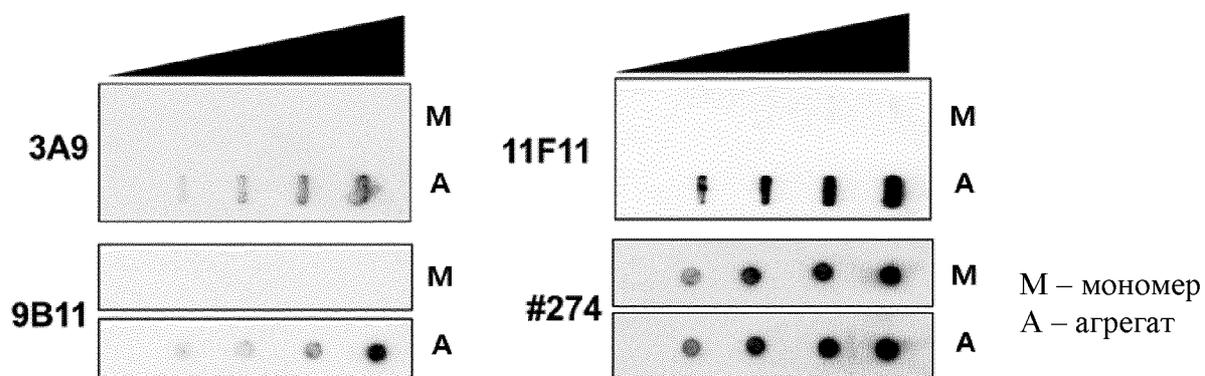
L-FR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:166-168, и

L-FR4, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:169-171.

4. Антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из Y775, P776, F778, R650, S791, L798, Glu779, L641, H808, E809, L813, V397, D435, W434, Y460 и C488 в белке, содержащем SEQ ID NO:410.

5. Переносчик биологически активного вещества через гематоэнцефалический барьер, содержащий антитело против IGF1R или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4.

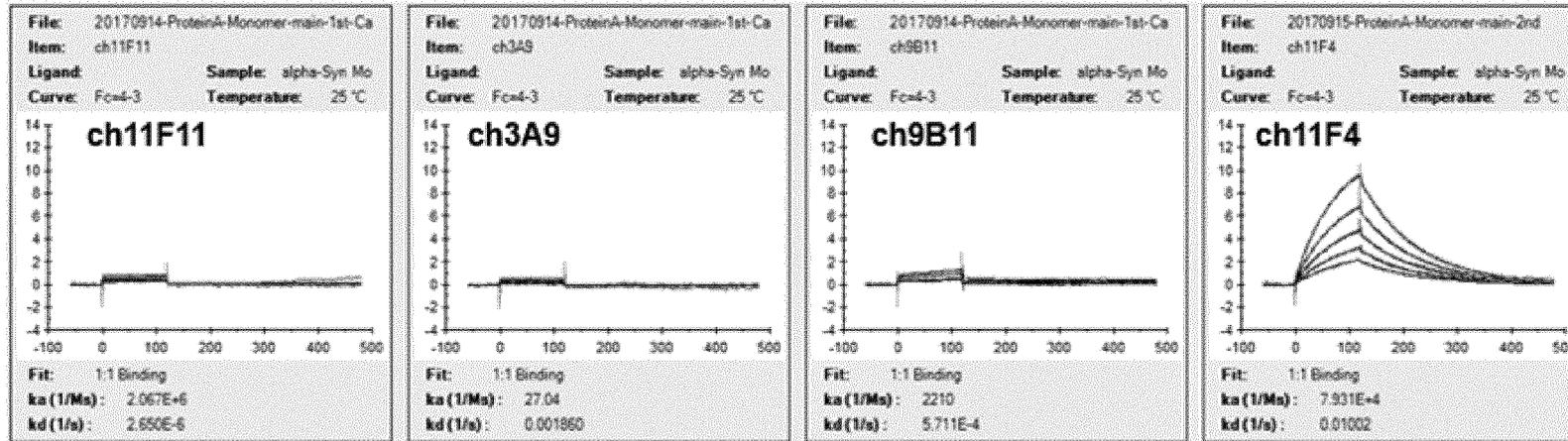
Фиг. 1



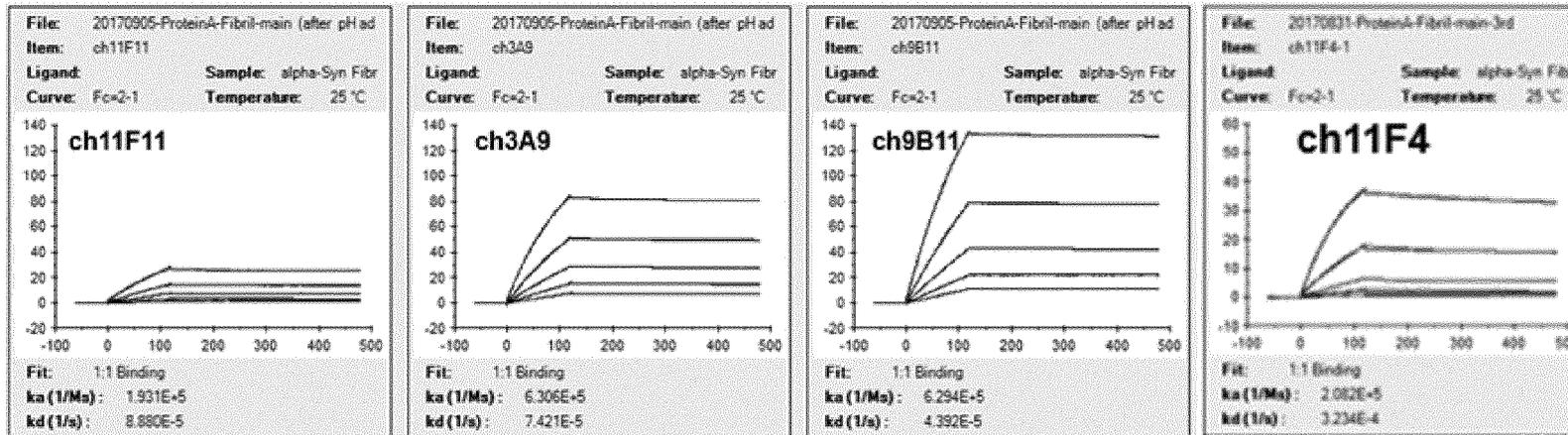
Фиг. 2

Клоны	EC ₅₀ (нг/мл)		EC ₅₀ (нМ)	
	Мономеры	Фибриллы	Мономеры	Фибриллы
3A9	–	319,4	–	2,129
9B11	–	184,9	–	1,233
11F11	–	326,5	–	2,177

Сенсограммы с мономерами



Сенсограммы с фибриллами



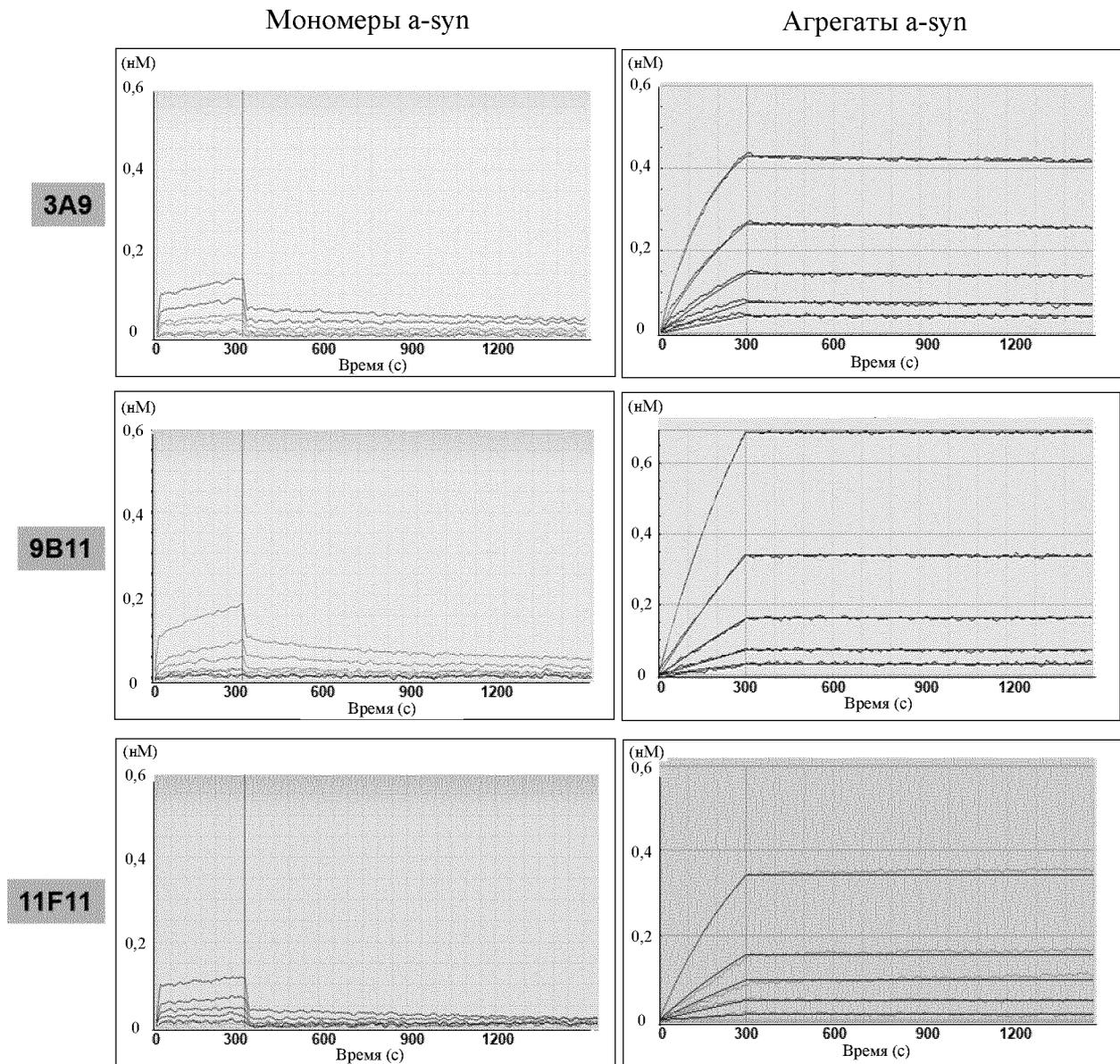
Фиг. 3а

Фиг. 3b

Клоны	K _D (M, x 10 ⁻⁹)	
	Мономеры	Фибриллы
3A9	—	1,320
9B11	—	0,904
11F11	—	2,873

«—» — проанализировано, но недоступно

Фиг. 4а



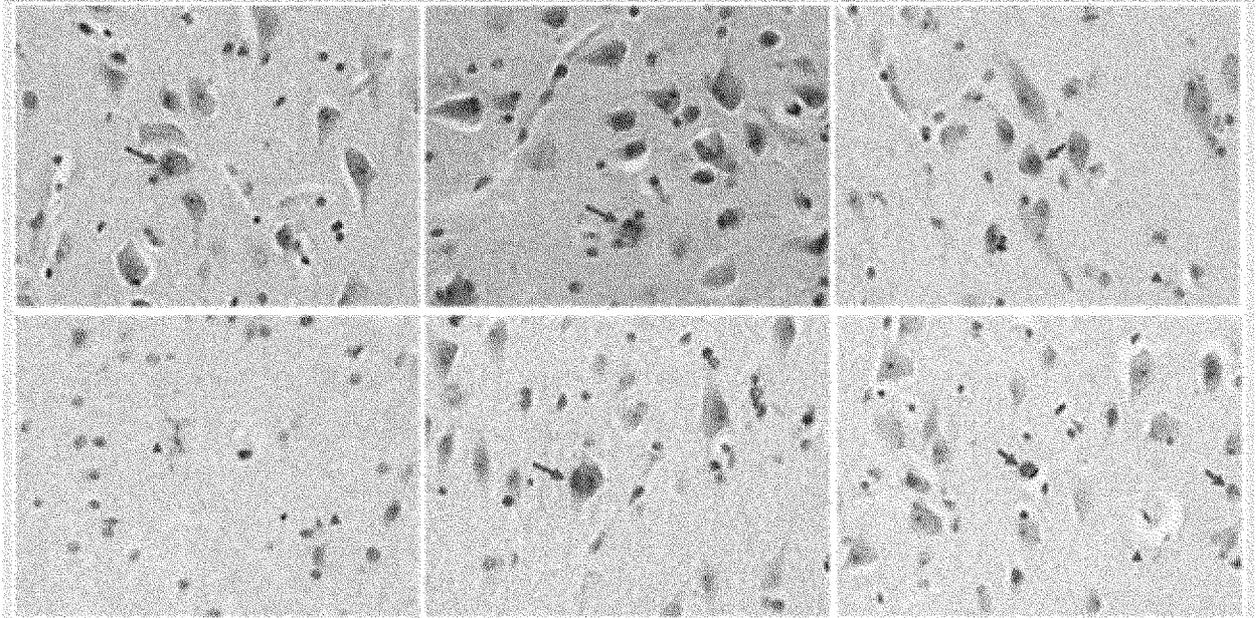
Фиг. 4b

Клоны	K _D (10 ⁻¹⁰ M)	
	Мономеры	Фибриллы
3A9	—	0,13
9B11	—	0,018
11F11	—	0,16

«—» — проанализировано, но недоступно

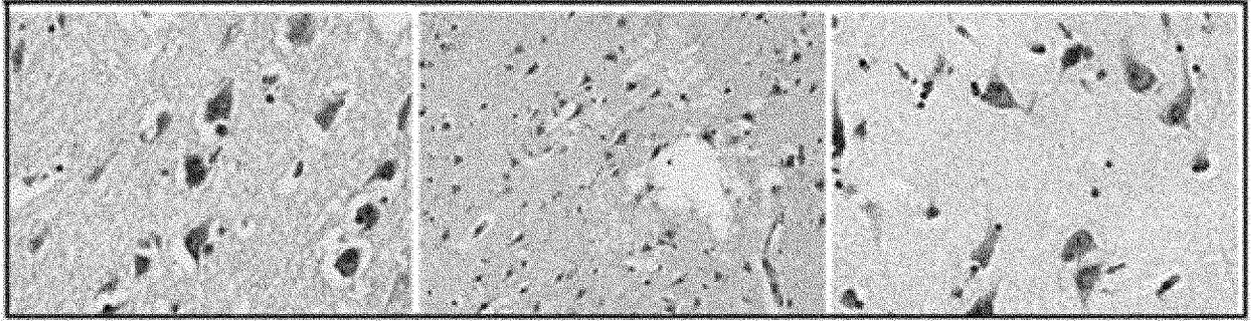
Фиг. 5а

3A9

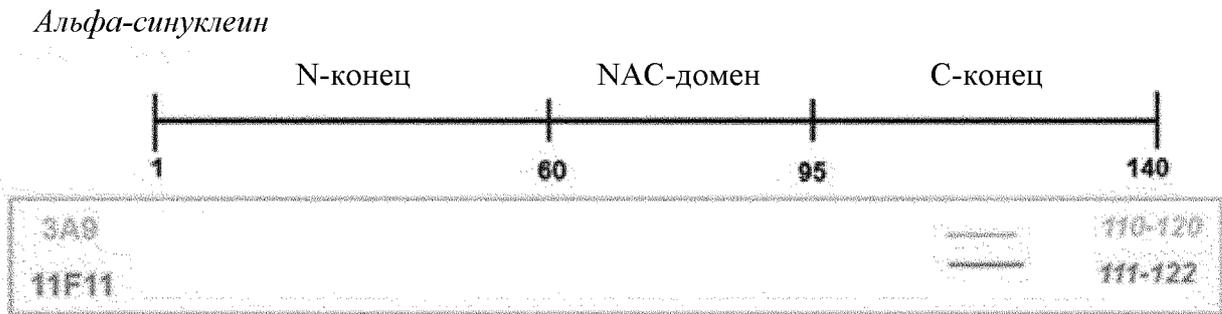


Фиг. 5b

11F11

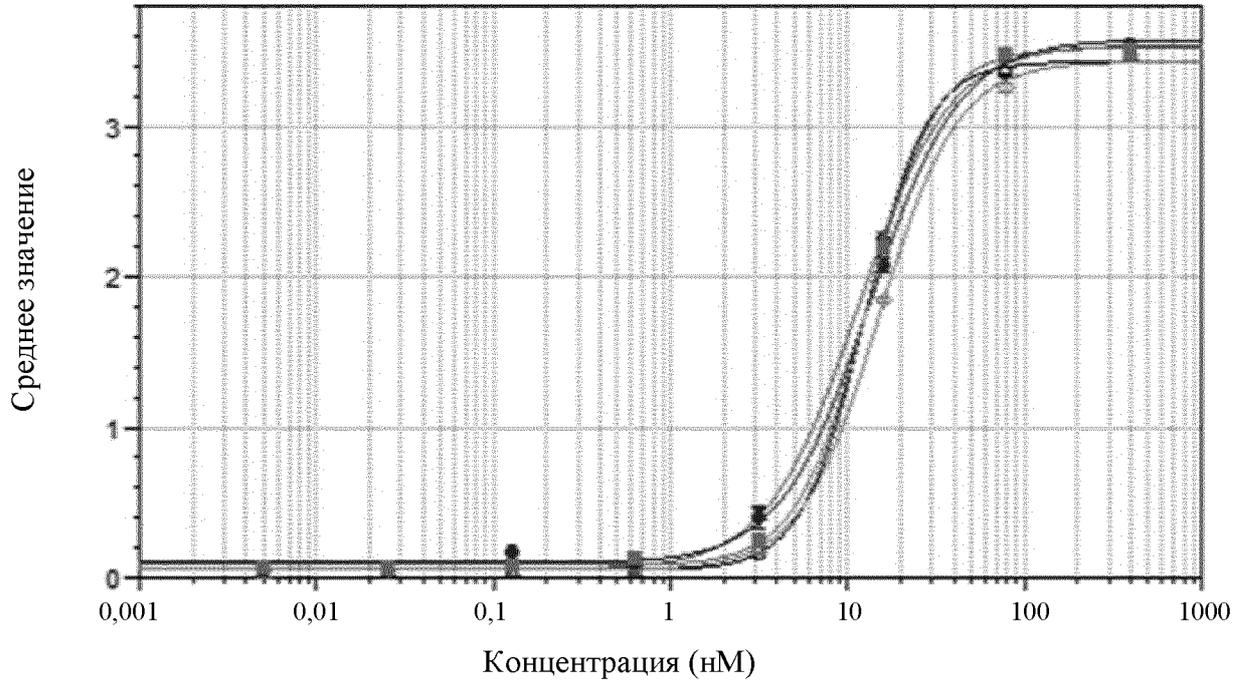


Фиг. 6



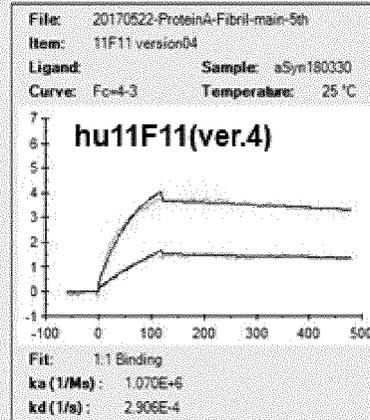
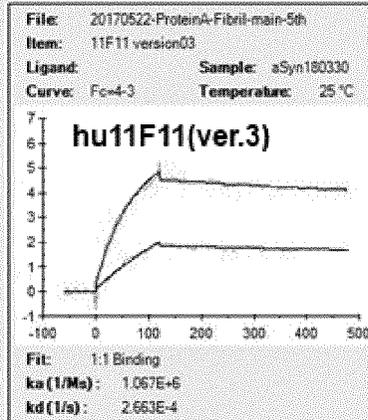
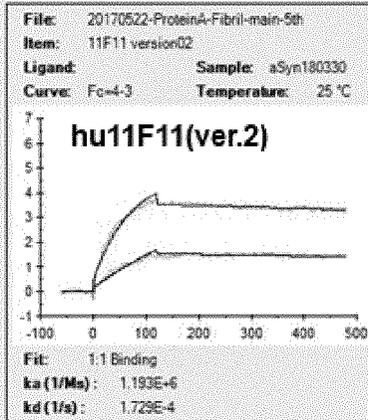
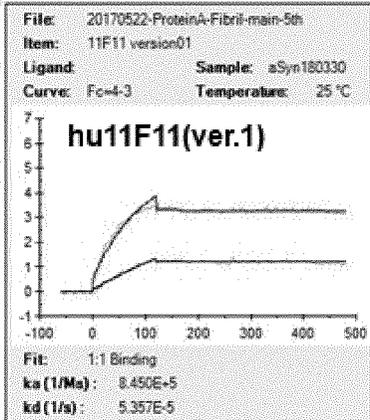
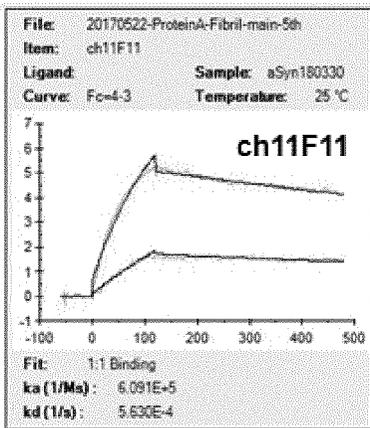
Фиг. 7

Стандартная кривая

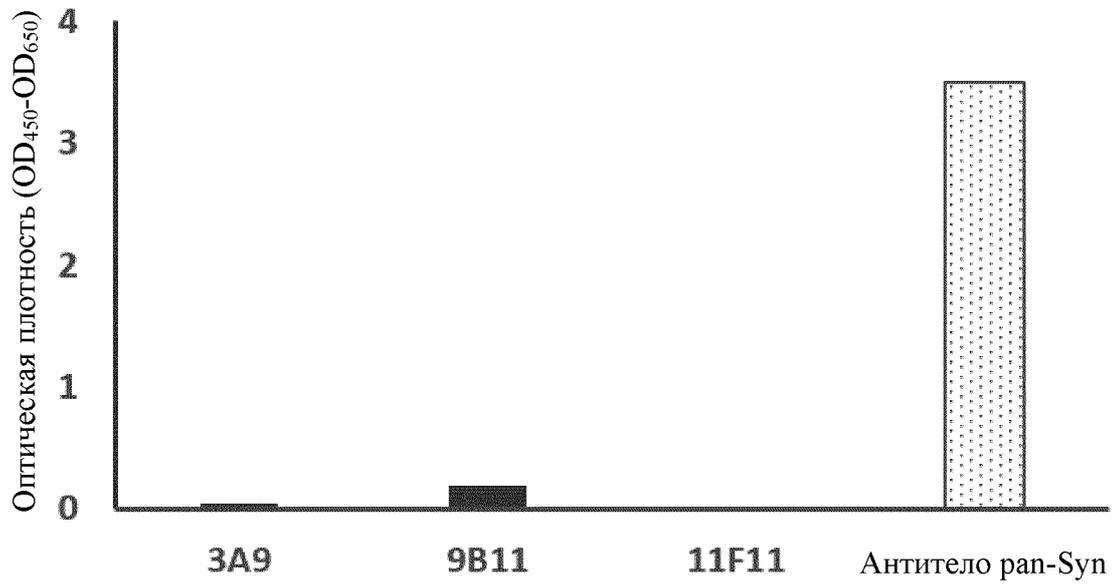


	A	B	C	D	R^2
○ Plot#1 (ch11F11(-RD): Концентрация vs среднее зн-е	0.0493	2.44	12.5	3.43	1
△ Plot#3 (hu11F11(ver.1)Концентрация vs среднее зн-е	0.0532	1.69	11.5	3.55	1
◇ Plot#4 (hu11F11(ver.2)Концентрация vs среднее зн-е	0.047	1.96	15.1	3.43	1
● Plot#5 (hu11F11(ver.3)Концентрация vs среднее зн-е	0.0958	1.71	13.4	3.58	0.999
■ Plot#6 (hu11F11(ver.4)Концентрация vs среднее зн-е	0.0791	2.18	12.9	3.52	1

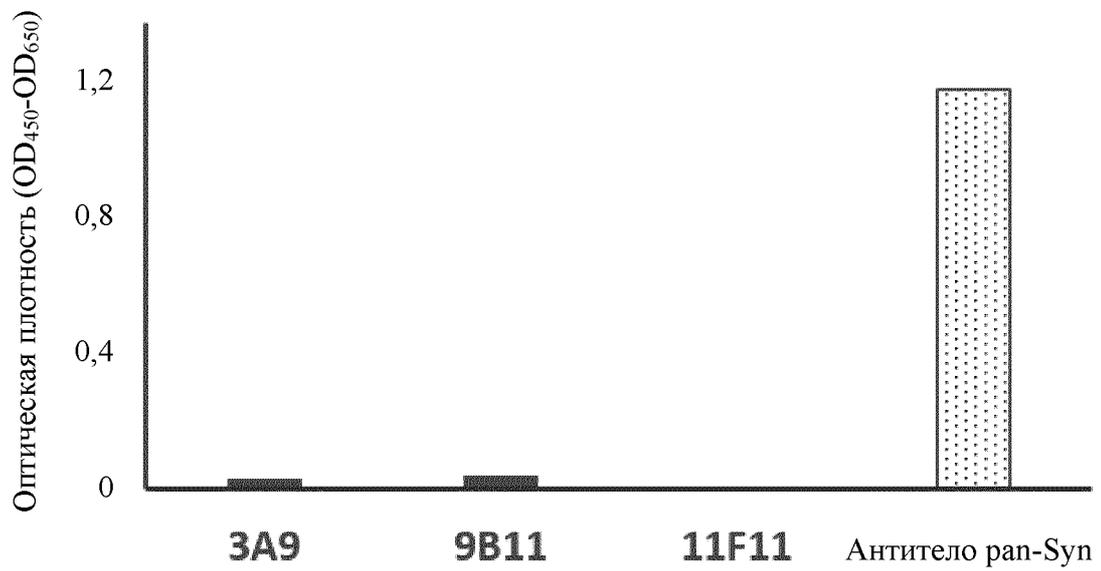
Фиг. 8



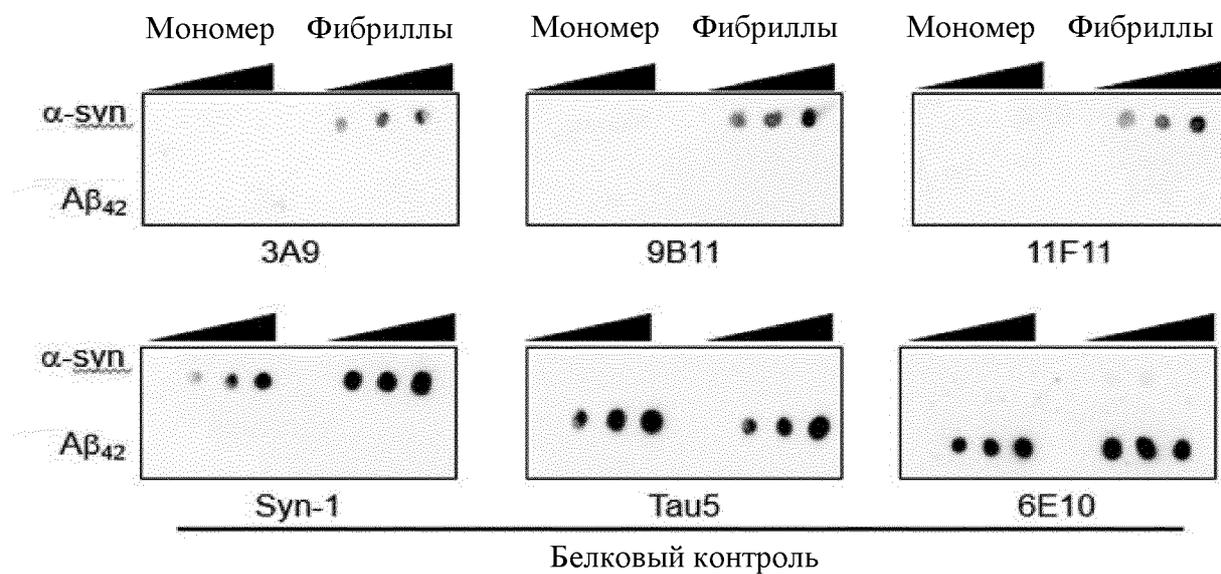
Фиг. 9а



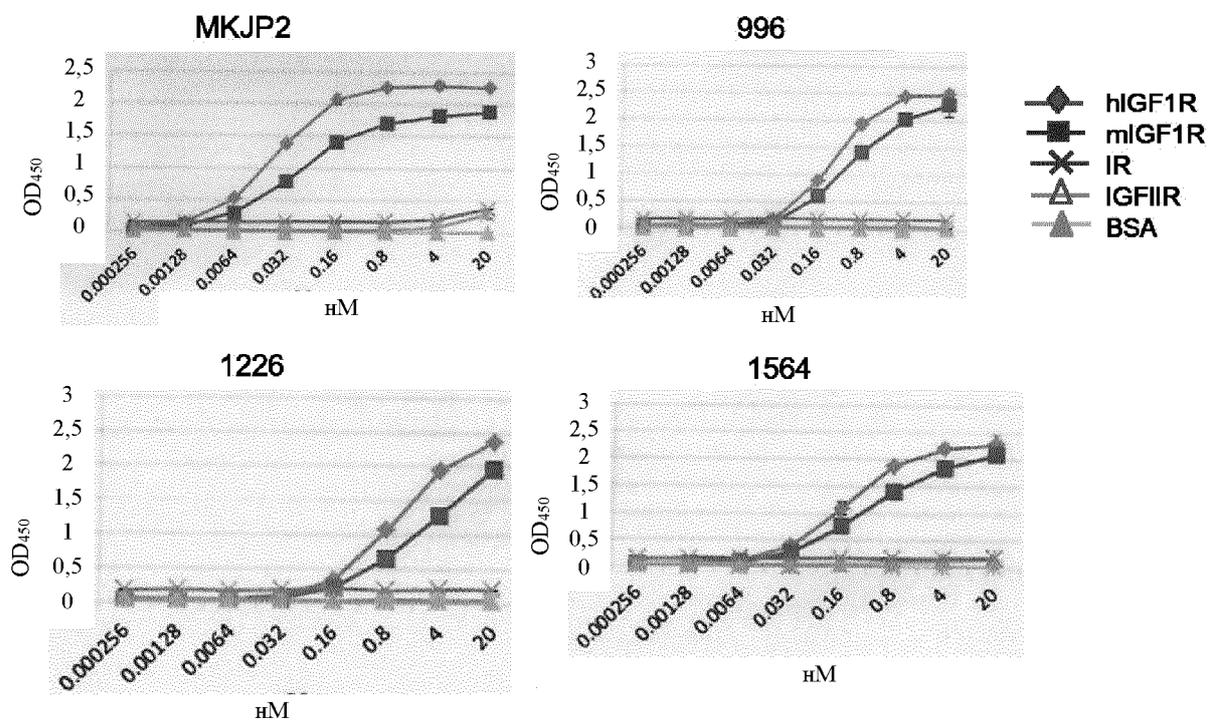
Фиг. 9b



Фиг. 10

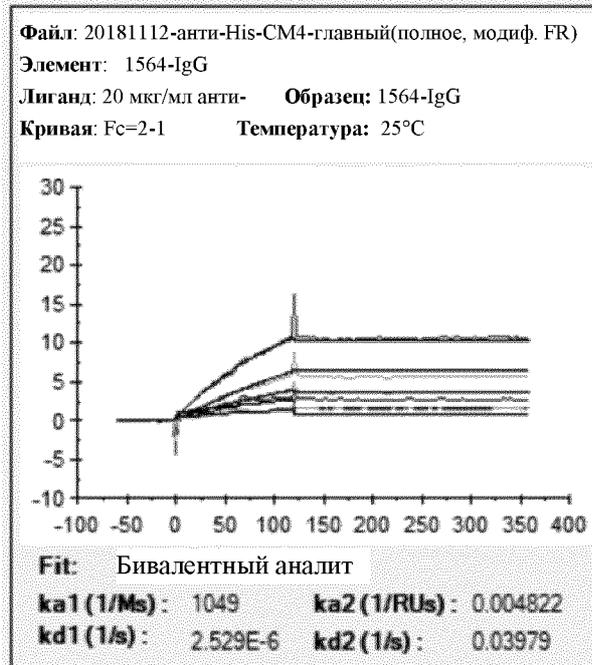
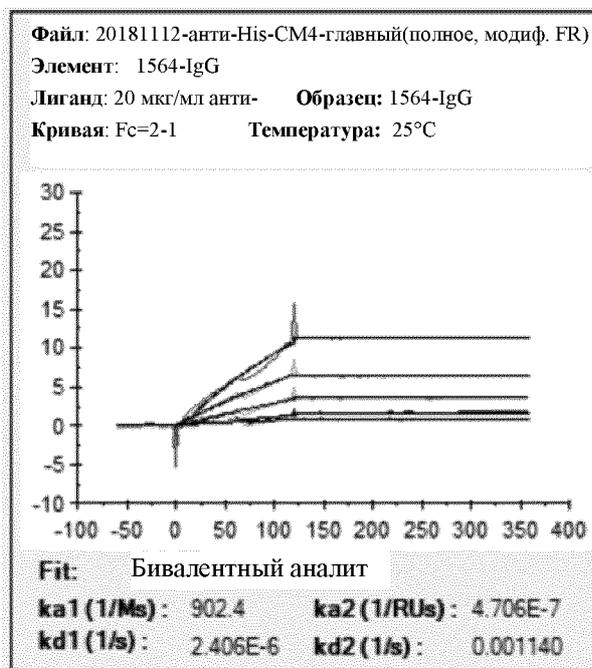


Фиг. 11а

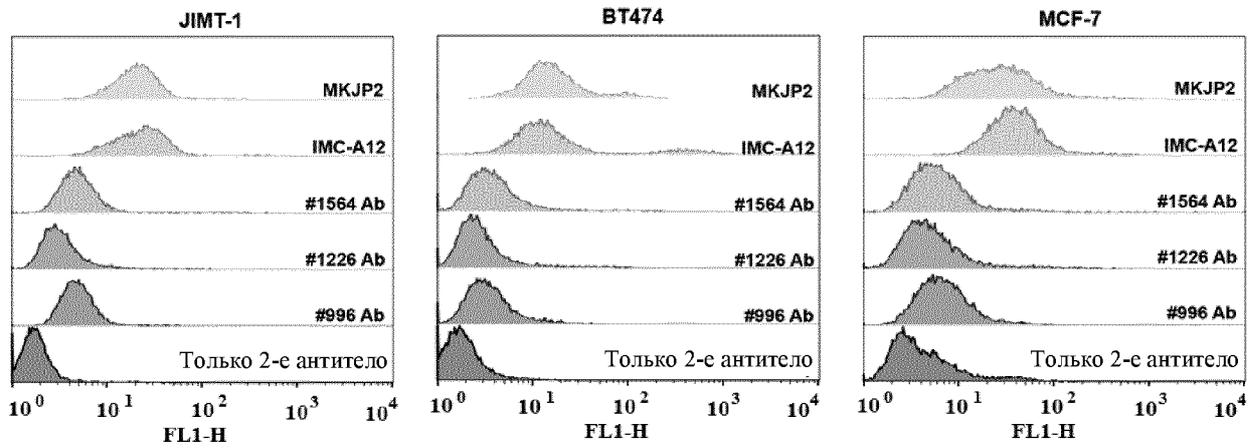


Фиг. 11b

1564 IgG



Фиг. 12а

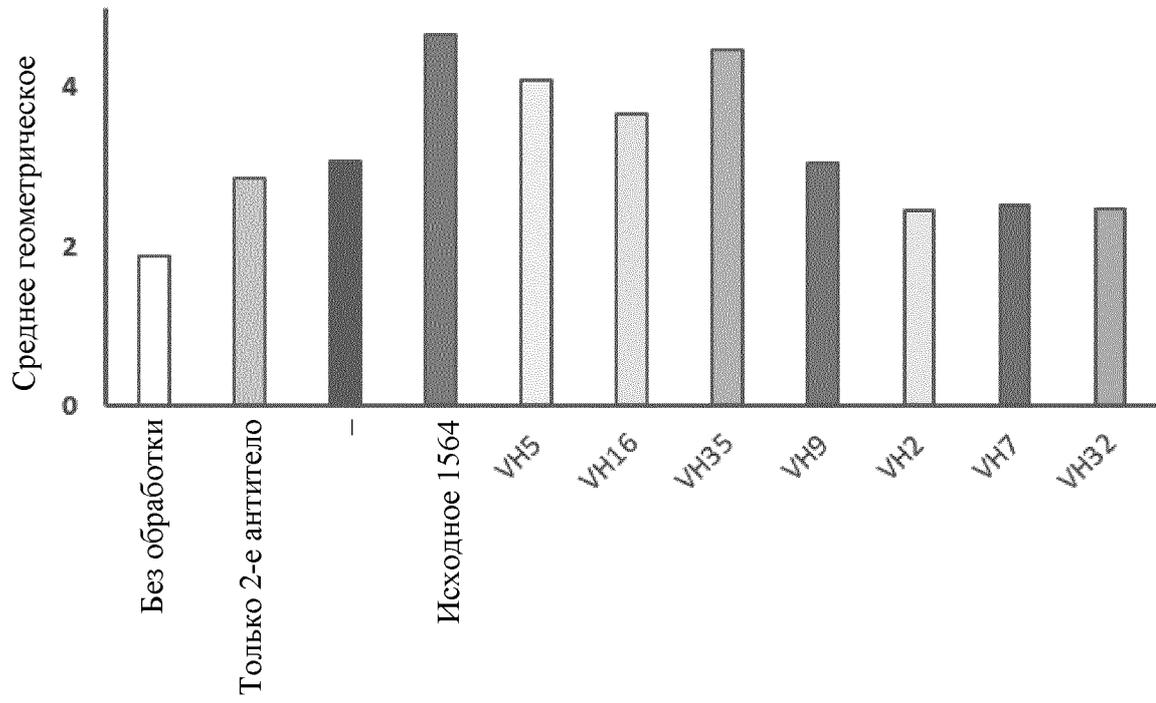


Название образца	MFI		
	JIMT-1	BT474	MCF7
Без обработки	1,36	1,8	2,51
Только 2-е антитело	1,89	1,93	4,53
#996 Ab	5,03	3,51	7,07
#1226 Ab	3,50	3,01	5,60
#1564 Ab	5,16	3,95	6,34
IMC-A12	22,99	18,34	40,08
MKJP2	20,67	16,43	26,67

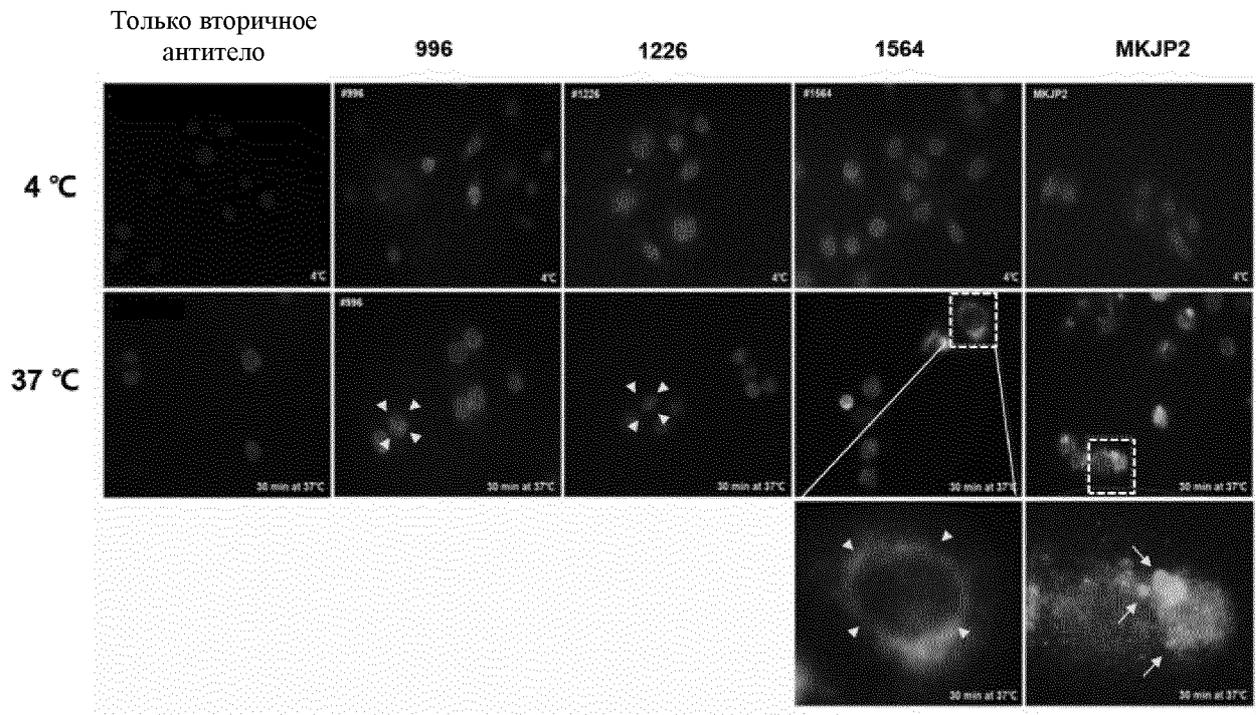
Фиг. 12б

Образцы	MFI
Только вторичное антитело	3,20
ch11F11	3,26
ch11F11-1564	4,37
1564 IgG	7,55

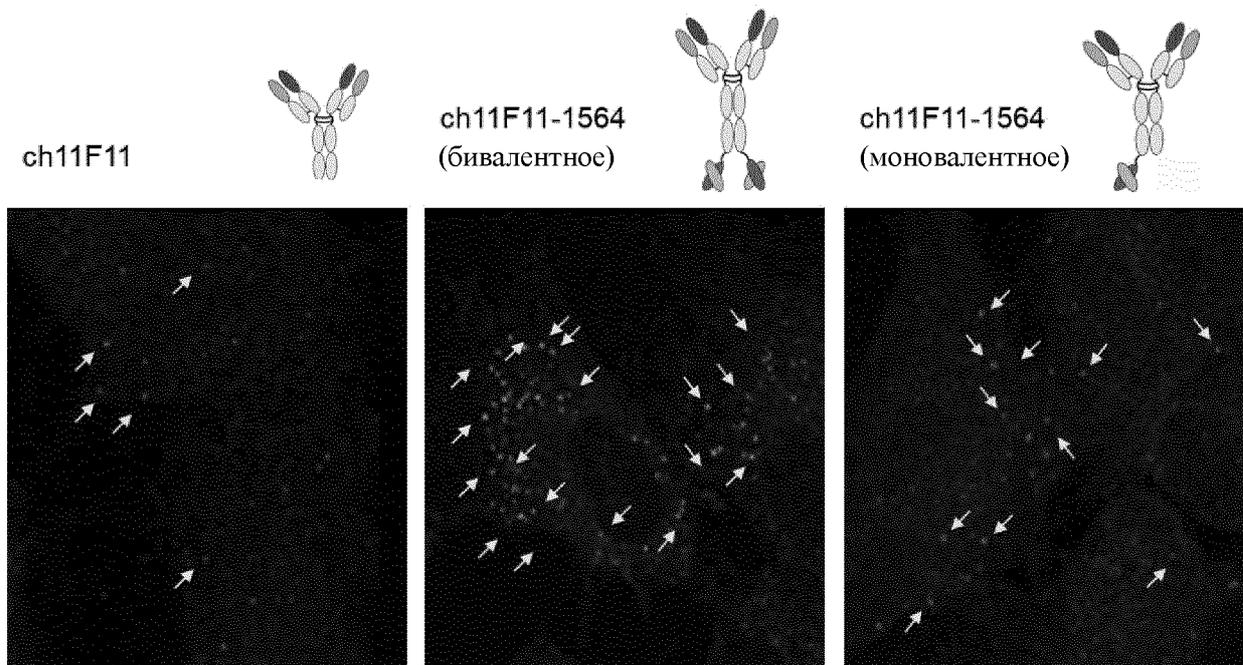
Фиг. 12с



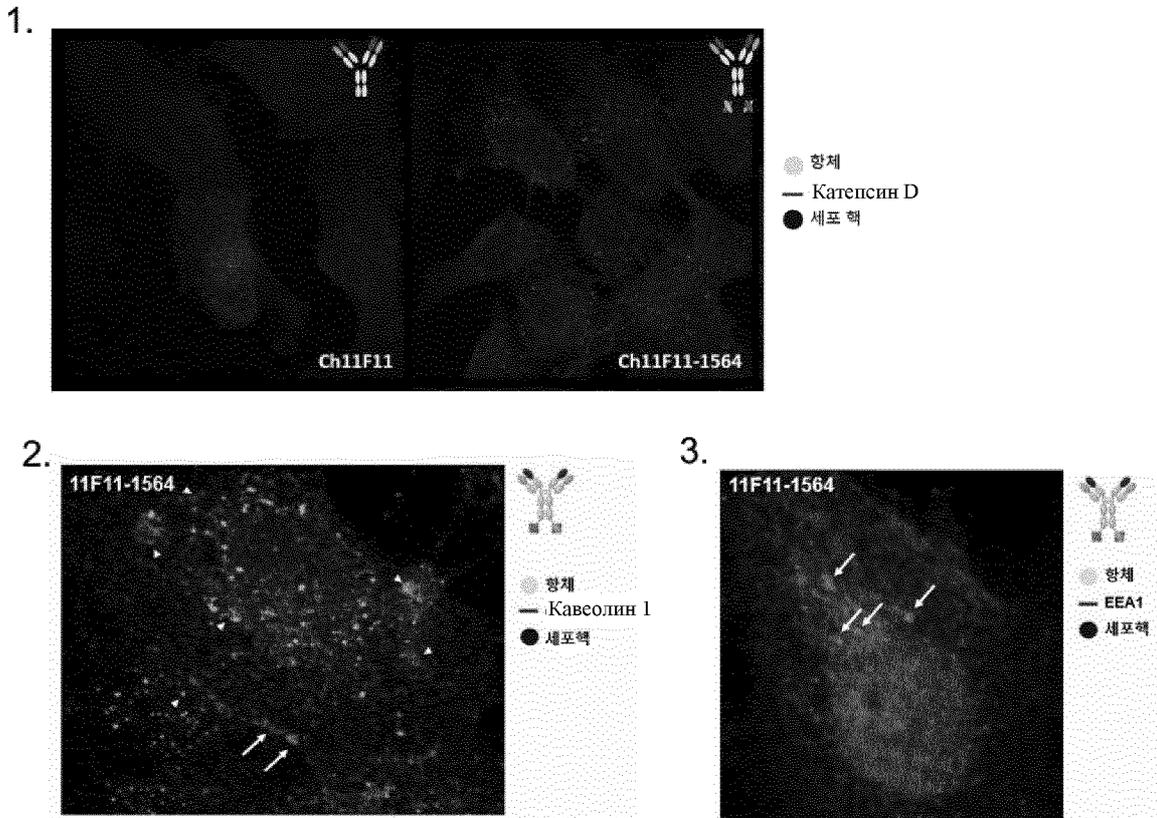
Фиг. 13а



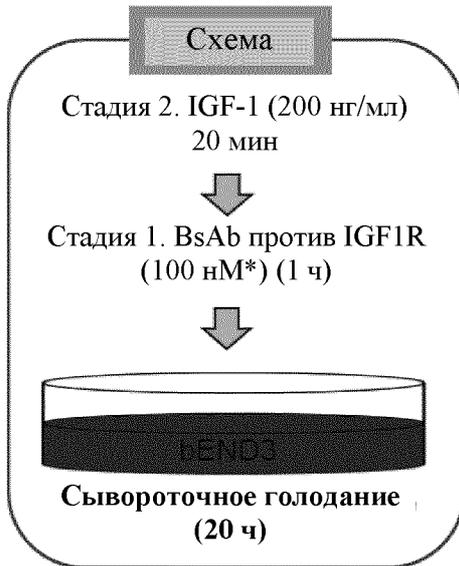
Фиг. 13б



Фиг. 13с

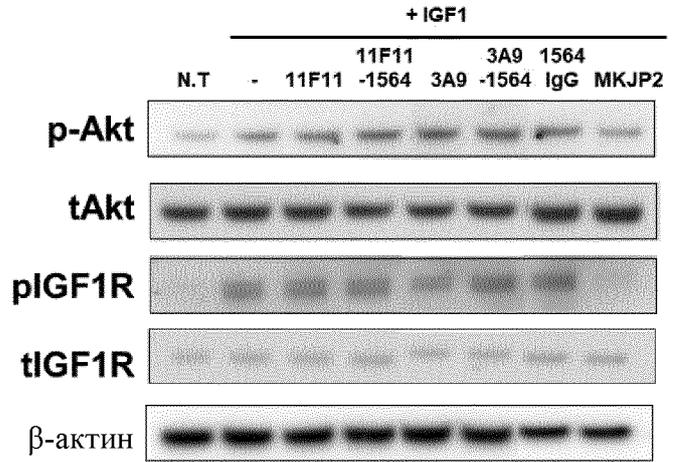


Фиг. 14с



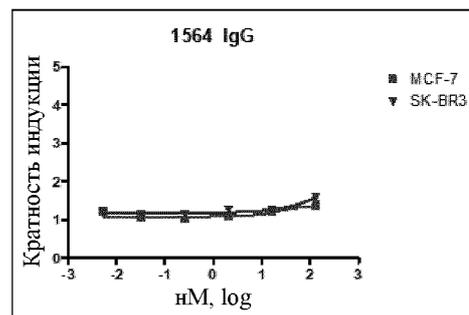
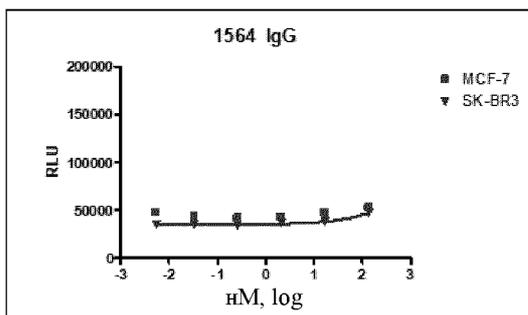
*Концентрация антител (100нМ):
IgG (15 мкг/мл), IgG-scFv (20 мкг/мл)

Остов ch11F11, ch3A9

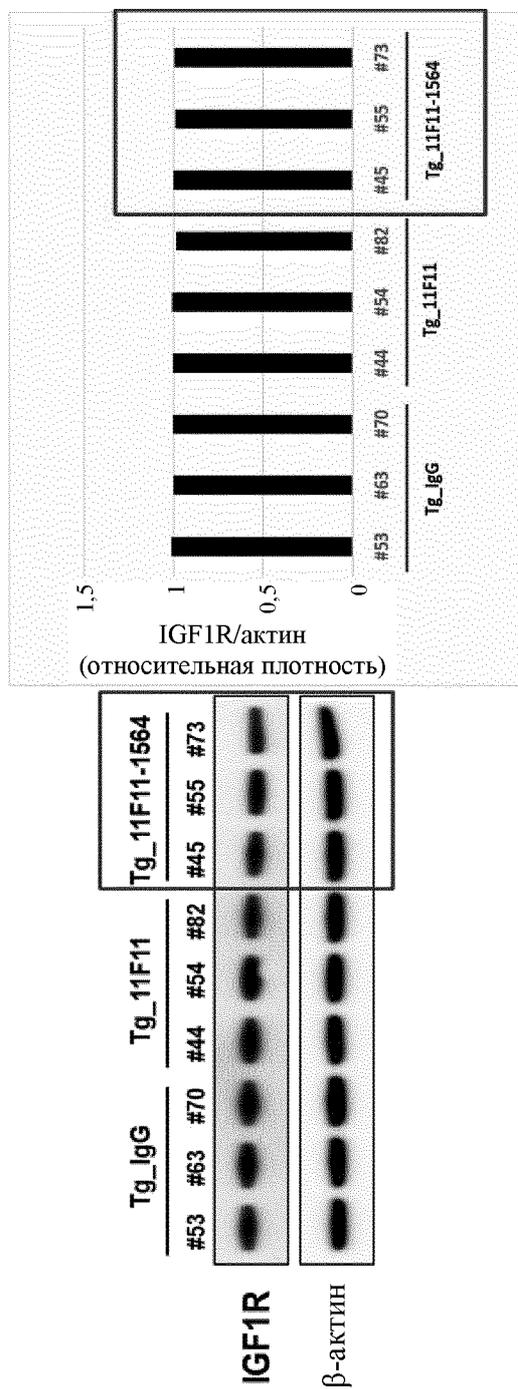


Фиг. 15а

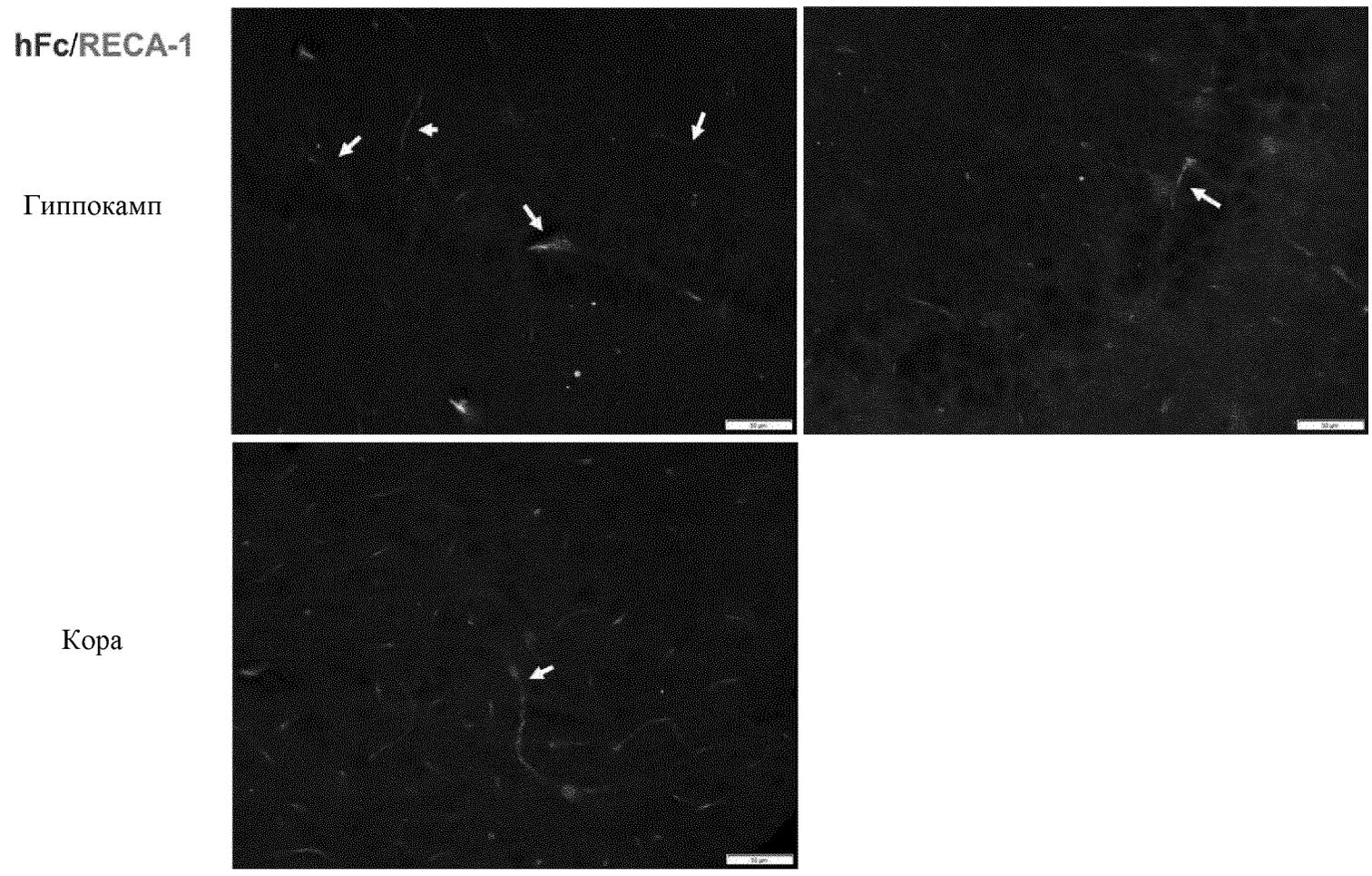
- MCF-7: высокая экспрессия IGF1R
- SK-BR3: экспрессия IGF1R



Фиг. 15b



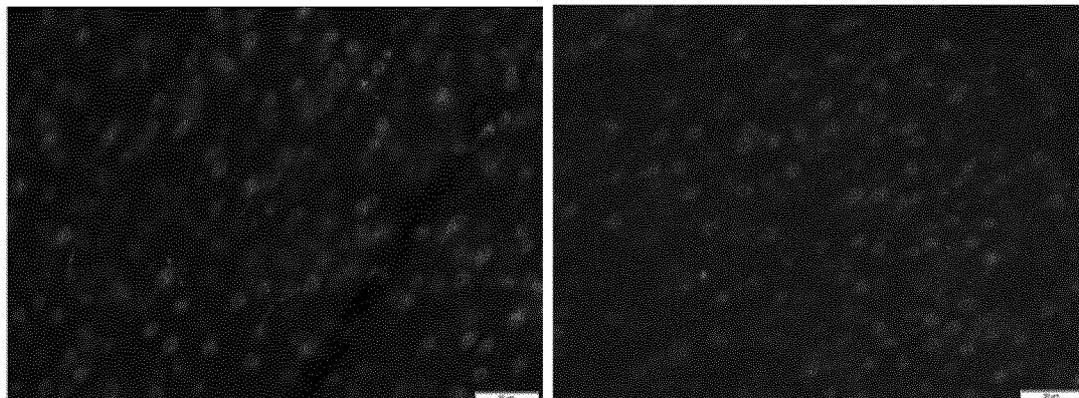
Фиг. 15с-1



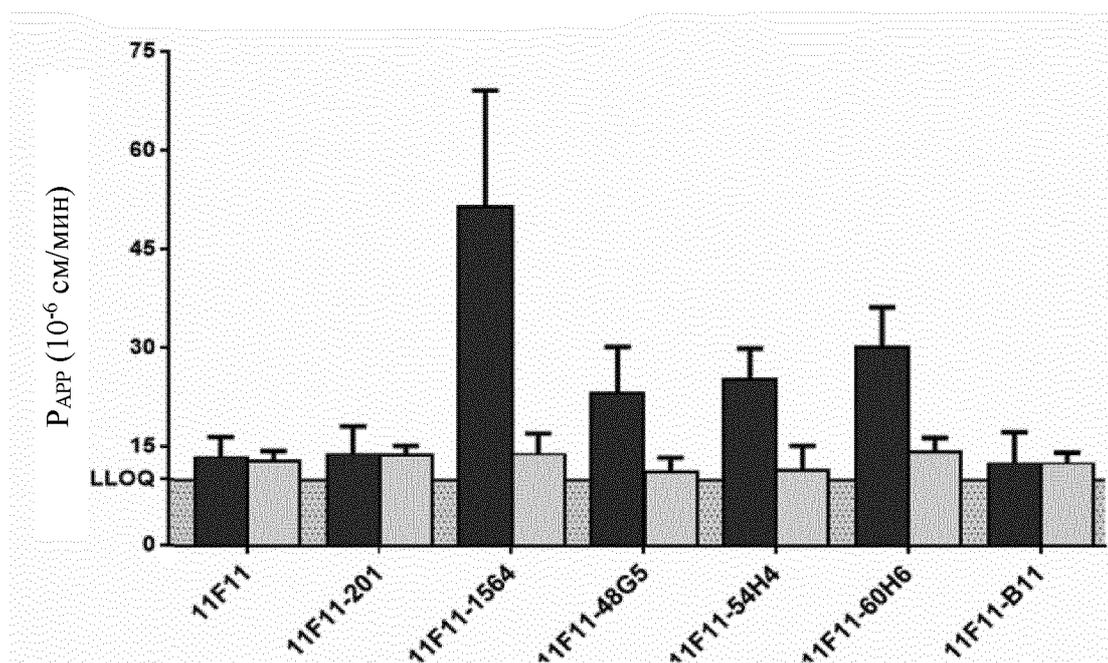
Фиг. 15с-2

hFc/NeuN

Кора

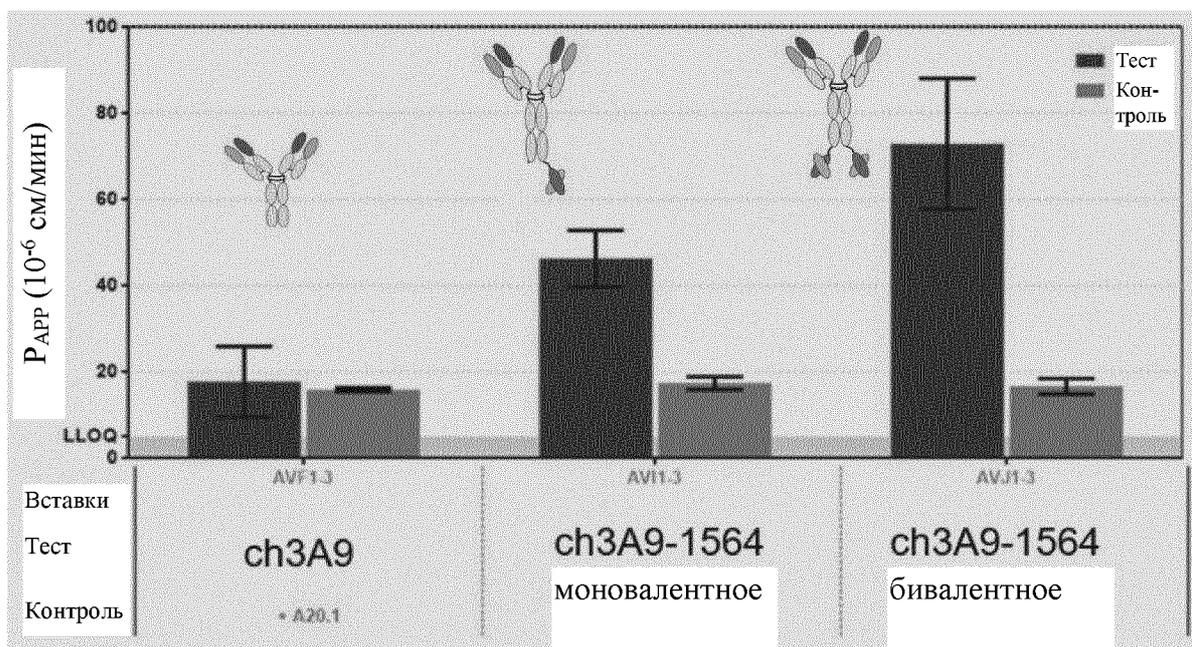


Фиг. 16а

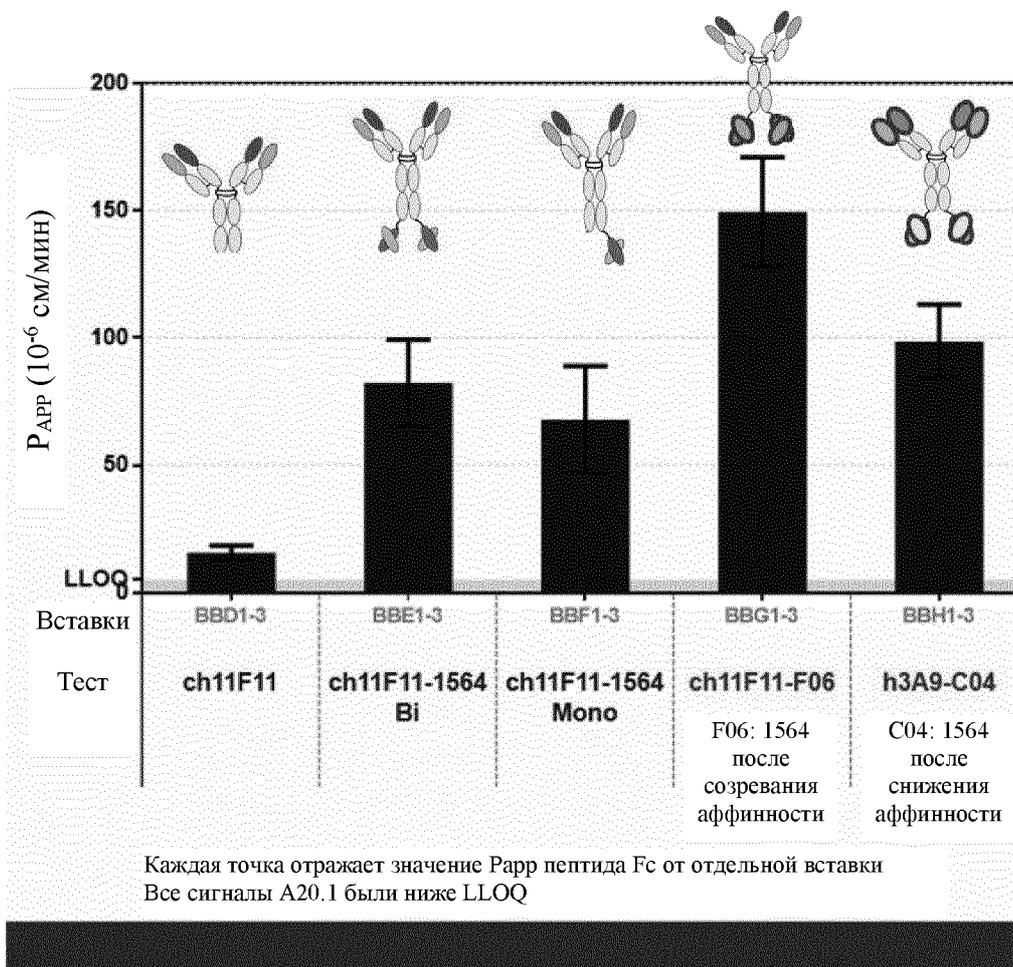


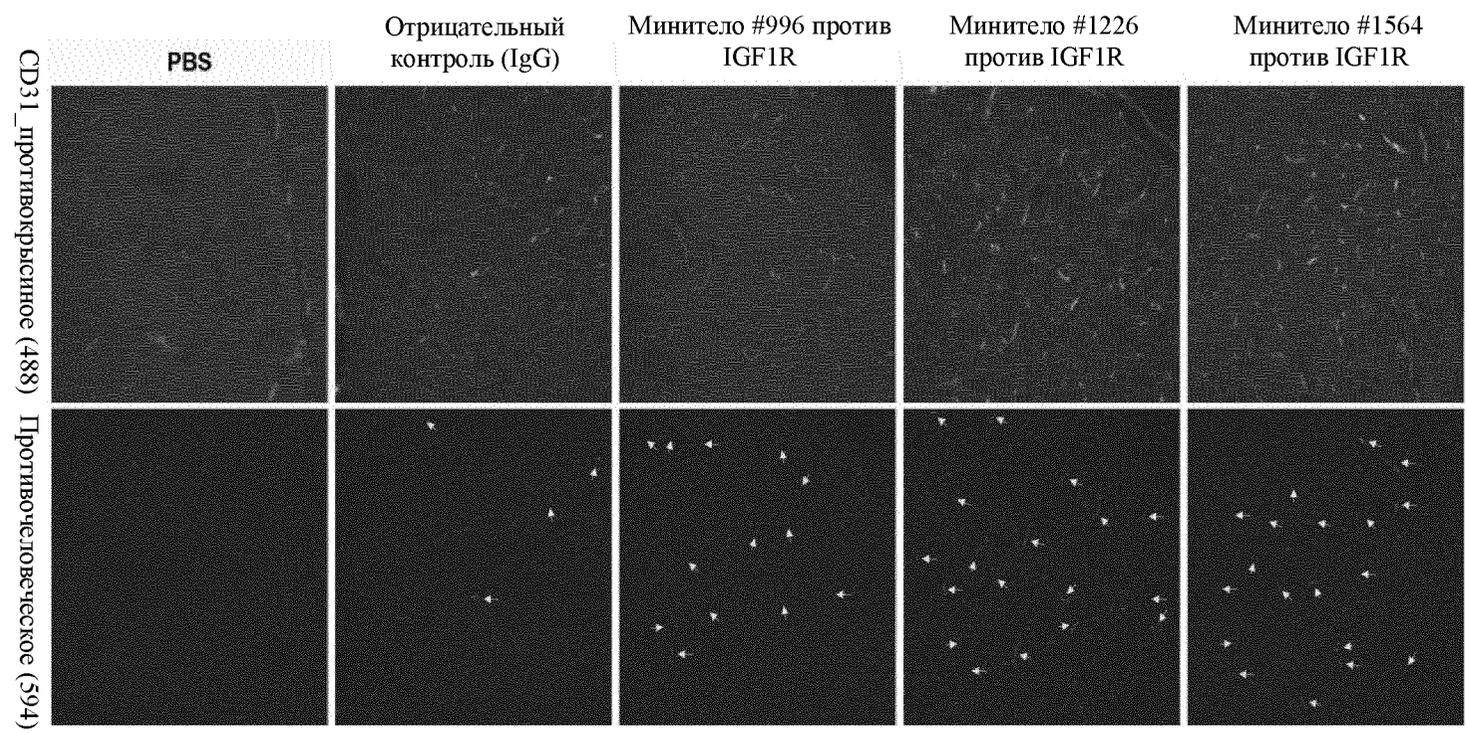
*201: Биоаналог Герцептина

Фиг. 16b



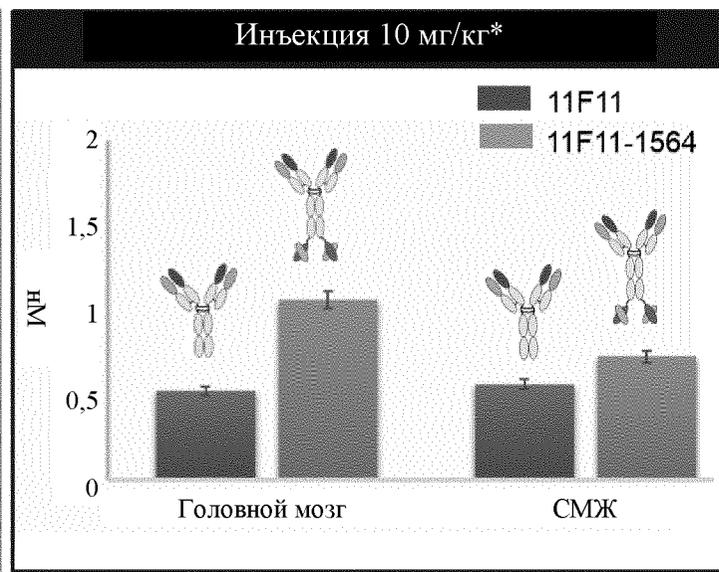
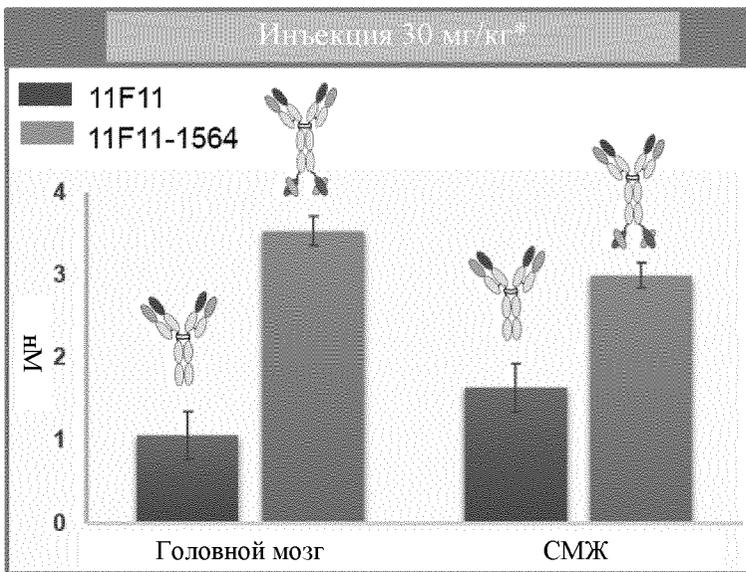
Фиг. 16с





Фиг. 17а

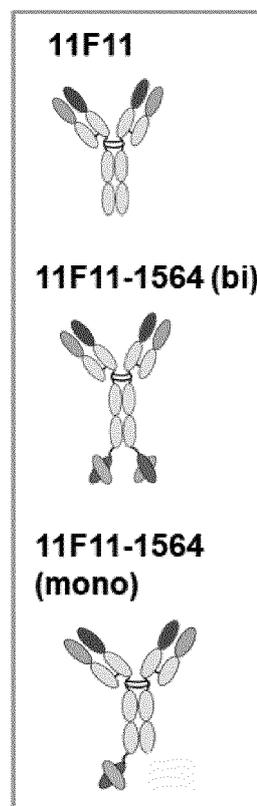
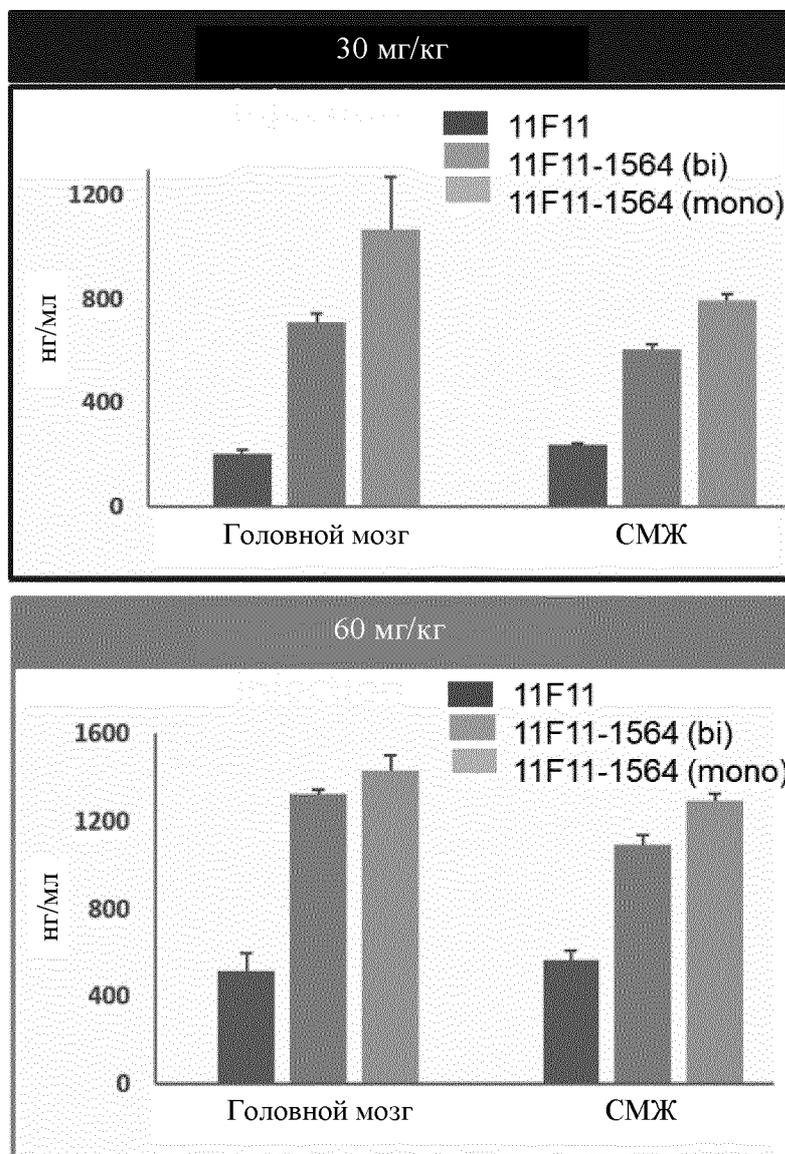
Фиксированные срезы головного мозга; CD31: маркер сосудов (верхний ряд); маркер антител (нижний ряд)



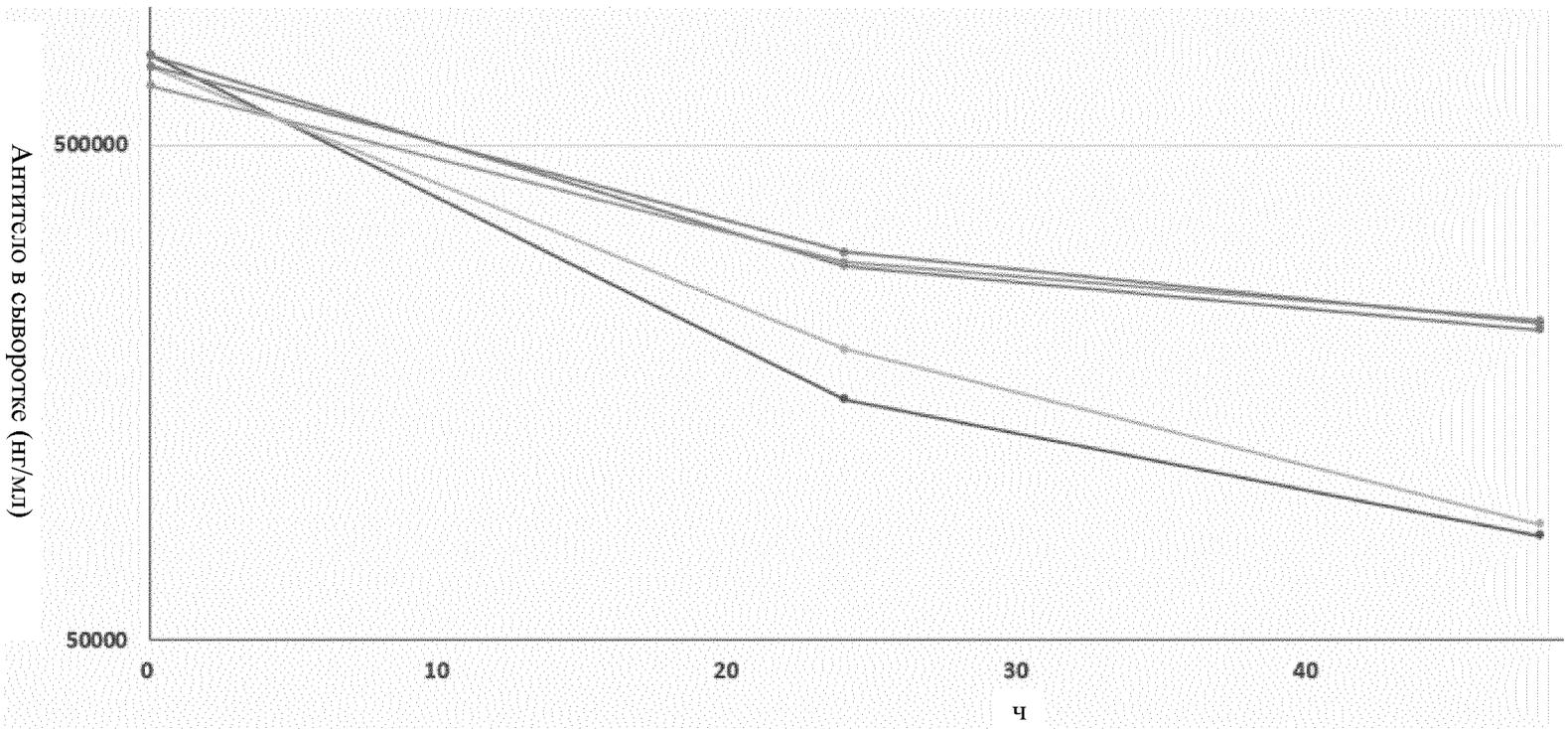
Фиг. 17b

Виспецифичное антитело к α -syn/IGF1R
и его применение

Фиг. 17с

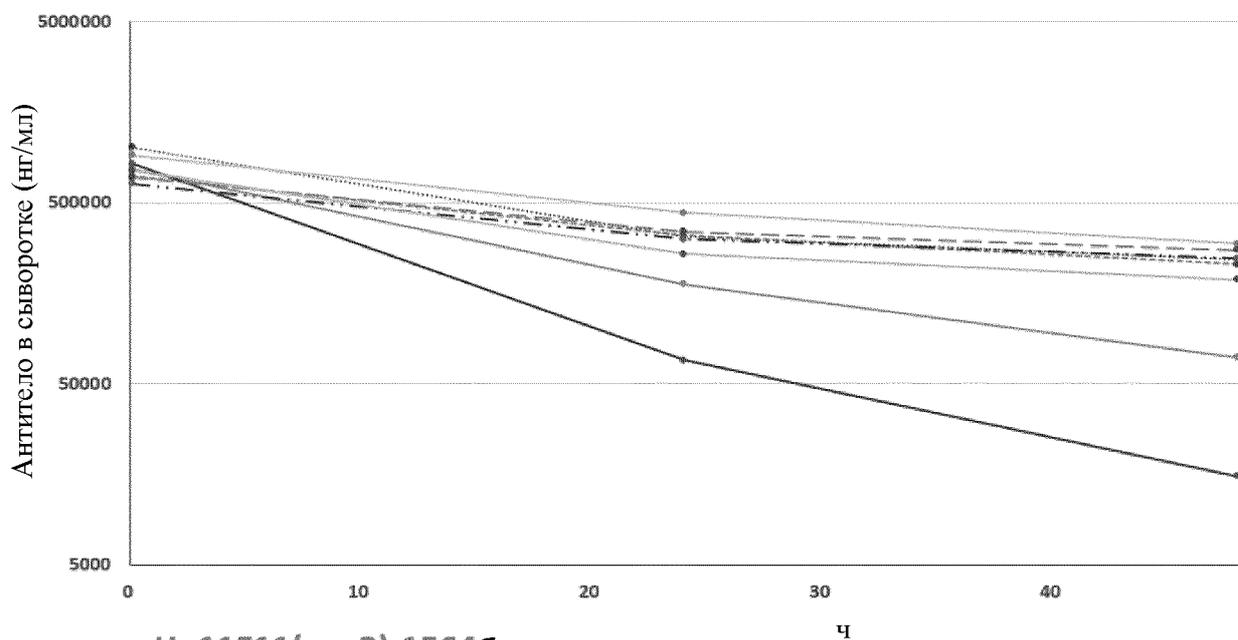


Фиг. 17d-1



ch11F11-1564_b бивалентное
ch11F11-1564_m моновалентное
ch11F11-C04 моновалентное
ch11F11-F06_b бивалентное
ch11F11-F06_m моновалентное

Фиг. 17d-2



Hu11F11(ver.2)-1564 бивалентное

Hu11F11(ver.2)-VH5 бивалентное

Hu11F11(ver.2)-VH16 бивалентное

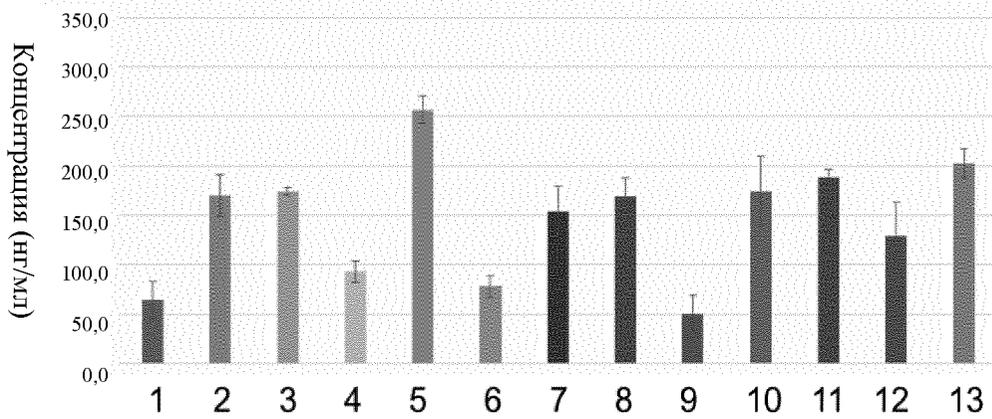
Hu11F11(ver.2)-VH35 бивалентное

Hu11F11(ver.2)-VH9 бивалентное

Hu11F11(ver.2)-VH2 бивалентное

Hu11F11(ver.2)-VH7 бивалентное

Hu11F11(ver.2)-VH32 бивалентное



	Клоны
1	ch11F11-1564 бивалентное
2	ch11F11-1564 моновалентное
3	ch11F11-C04 моновалентное
4	ch11F11-F06 бивалентное
5	ch11F11-F06 моновалентное
6	hu11F11(ver.2)-1564 бивалент
7	hu11F11(ver.2)-VH5 бивалент
8	hu11F11(ver.2)-VH16 бивалент
9	hu11F11(ver.2)-VH35 бивалент
10	hu11F11(ver.2)-VH9 бивалент
11	hu11F11(ver.2)-VH2 бивалент
12	hu11F11(ver.2)-VH7 бивалент
13	hu11F11(ver.2)-VH32 бивалент

Фиг. 17e

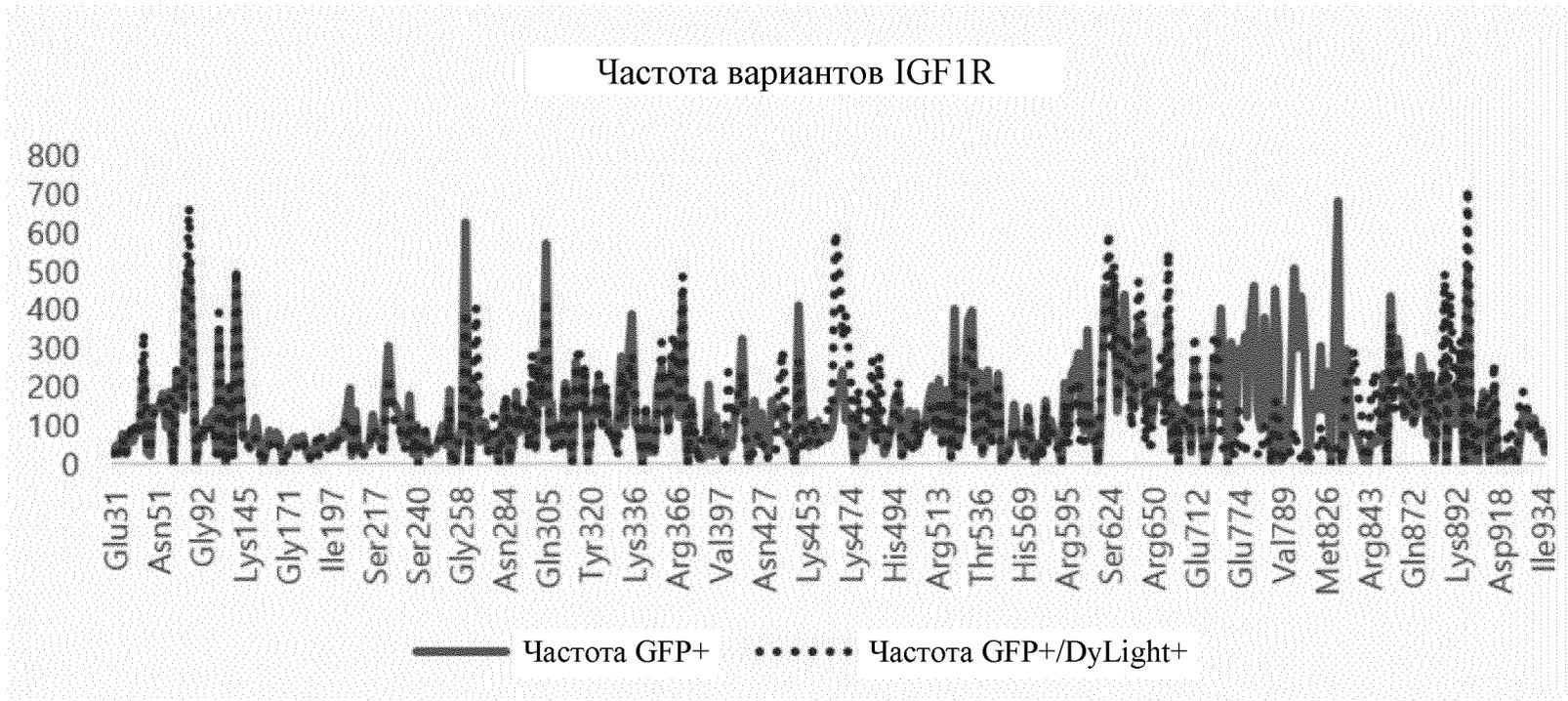
Виспецифичное антитело к a-syn/IGF1R
и его применение

Фиг. 18а

Антитело 1564	Сайт	Температура (4°C)	Модификация	% содержания
LCDR1	scFv (483-511)	4	Без модификаций	99,2
			Дезамидирование	0,8
LCDR1	scFv (483-511)	40	Без модификаций	99,0
			Дезамидирование	1,0
LCDR2	scFv (512-527)	4	Без модификаций	84,7
			Дезамидирование	15,3
LCDR2	scFv (512-527)	40	Без модификаций	83,1
			Дезамидирование	16,9
LCDR3	scFv (546-571)	4	Без модификаций	95,4
			Дезамидирование	4,6
LCDR3	scFv (546-571)	40	Без модификаций	90,2
			Дезамидирование	9,8
HCDR2	scFv (639-660)	4	Без модификаций	55,8
			Дезамидирование	44,2
HCDR2	scFv (639-660)	40	Без модификаций	52,7
			Дезамидирование	47,3
Каркасная область 1564	scFv (672-682)	4	Без модификаций	95,6
			Дезамидирование	4,4
Каркасная область 1564	scFv (672-682)	40	Без модификаций	95,7
			Дезамидирование	4,3

Фиг. 18b

CDR (остаток, пептид)	Мутанты
LCDR2 (N51, LLIYANSN)	N51D
LCDR3 (остаток N95a, GAWDDSLNG)	N95aK
	N95aH
	N95aR
	N95aD
HCDR2 (N54, AISYDNGNT)	N54D
	N54Q

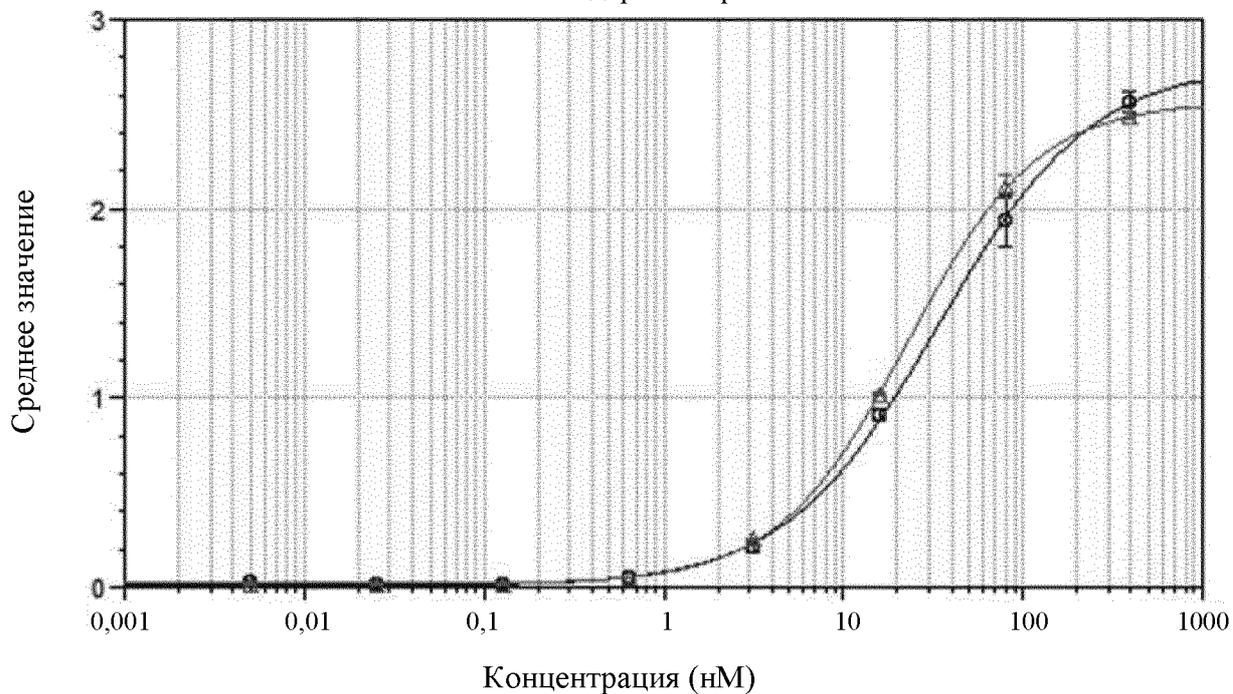


Фиг. 19

Связывающая область клона 1564	
Внутри FN2	Y775, P776, F778, R650, S791, L798 и Glu779

Фиг. 20а

Стандартная кривая

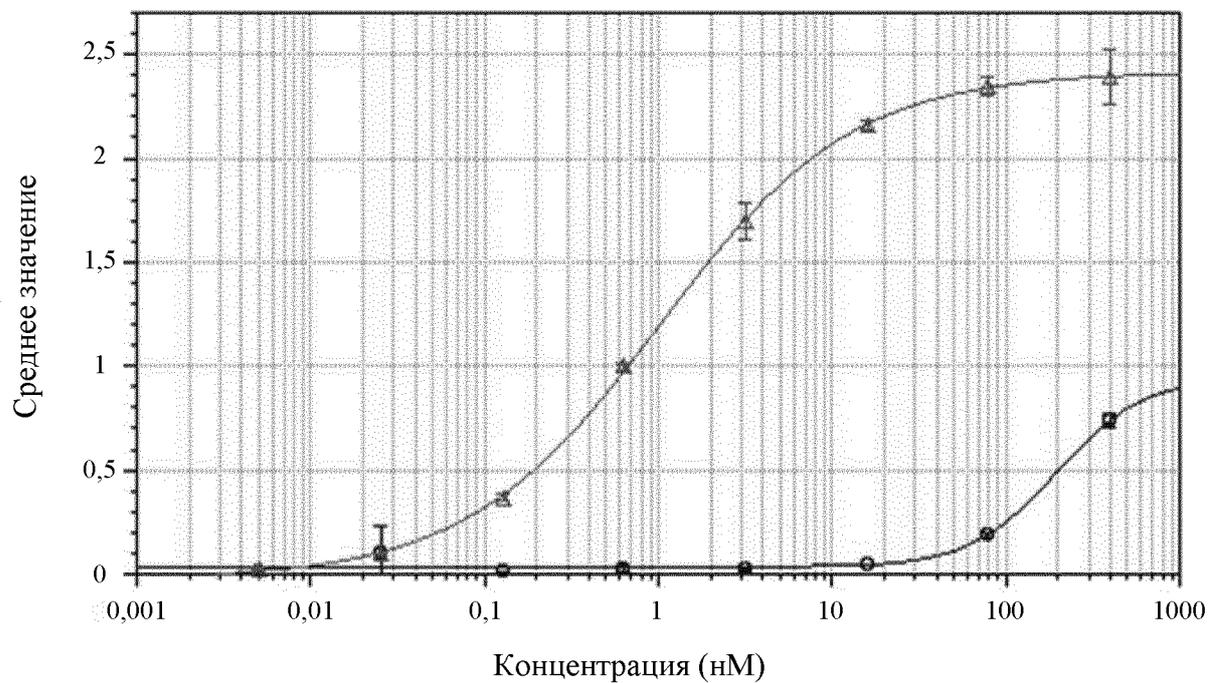


4-P Fit: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$:		A	B	C	D	R ²
○ Plot#1 (ch11F11: Концентрация vs ср. значение)		0.00522	1.02	33.8	2.77	1
△ Plot#3 (ch11F11-1564: Конц-я vs ср. значение)		0.0159	1.2	22.7	2.57	1

Опция подгонки по кривой – Фиксированное значение массы

Фиг. 20b

Стандартная кривая



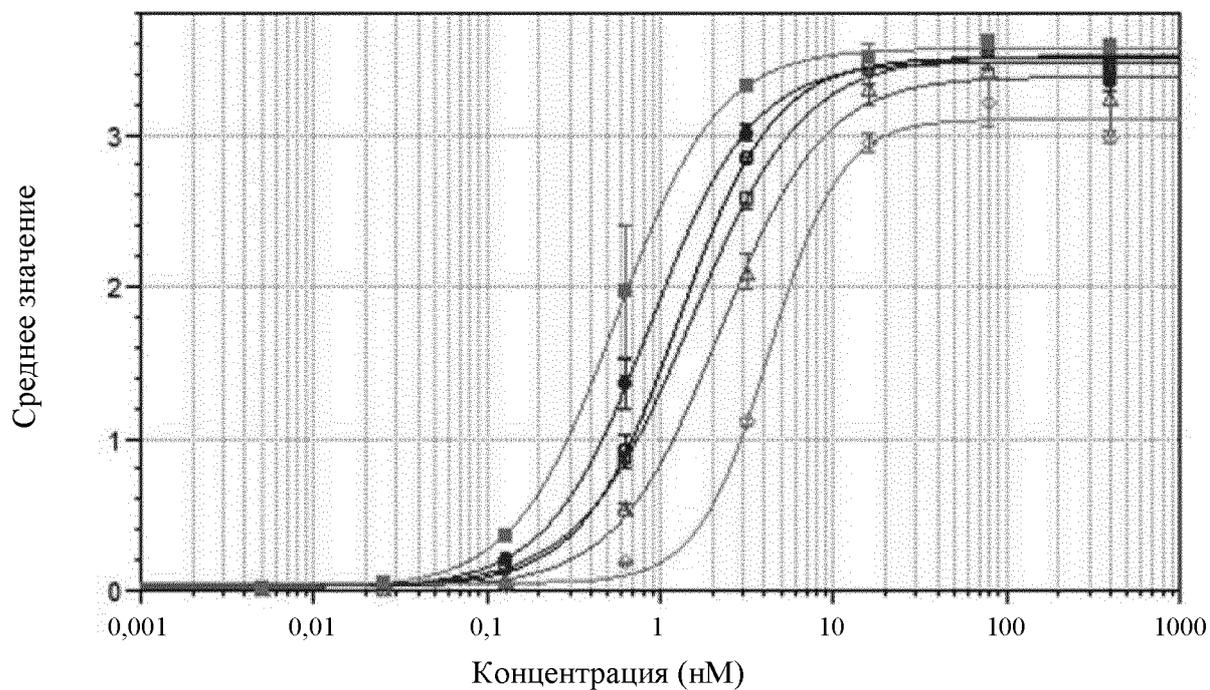
4-P Fit: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
○ Plot#1 (ch11F11: Концентрация vs ср. значение)	0.0321	1.73	196	0.945	0.985
△ Plot#3 (ch11F11-1564: Конц-я vs ср. значение)	-0.0248	0.781	1.01	2.42	1

Опция подгонки по кривой – Фиксированное значение массы

Фиг. 20с

Стандартная кривая

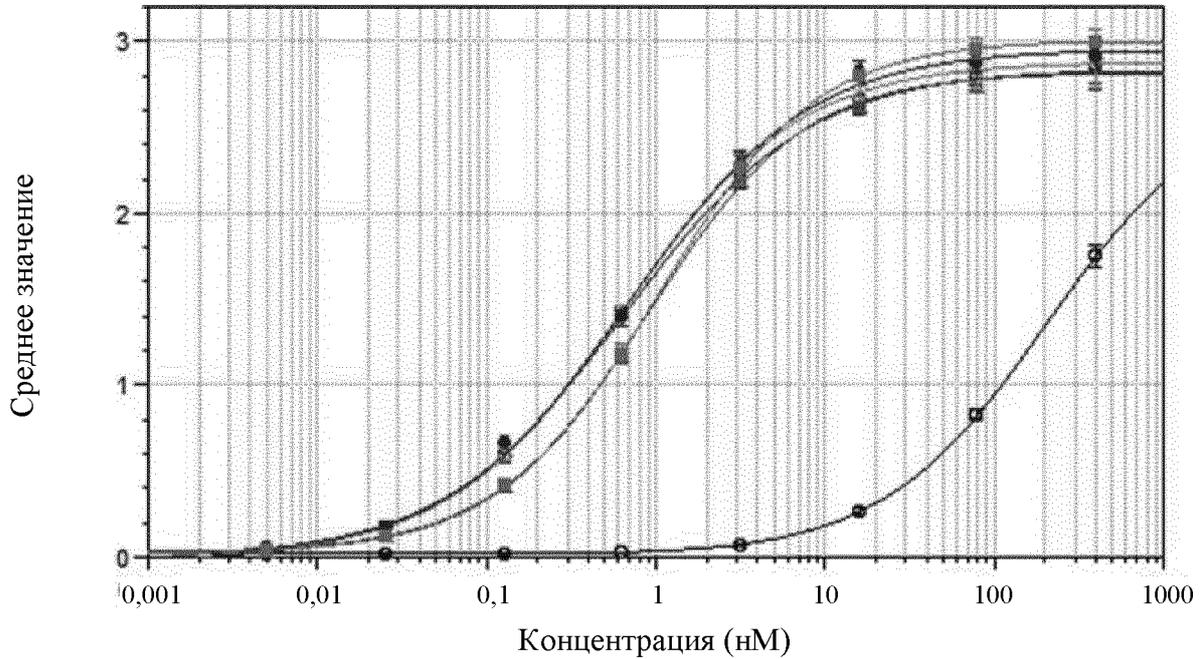


	A	B	C	D	R^2
○ Plot#4 (ch11F11(-RD)_Конц-я vs ср.значение	0.0238	1.56	1.27	3.51	0.999
□ Plot#1 (ch11F11-1564(-RD)_Конц-я vs ср.значение	0.0186	1.34	1.5	3.52	0.999
△ Plot#2 (ch11F11-1564(-RD) Только концентрация	0.02	1.45	2.21	3.39	0.998
◇ Plot#3 (hu11F11-1564(ver.2)Конц-я vs ср.значение	0.0445	2.11	4.27	3.11	0.997
● Plot#5 (hu11F11-1564(ver.3)Конц-я vs ср.значение	0.0138	1.47	0.874	3.48	0.999
■ Plot#6 (hu11F11-1564 (ver.3) Только конц-ция	0.00929	1.48	0.559	3.57	1

Опция подгонки по кривой – Фиксированное значение массы

Фиг. 20d

Стандартная кривая

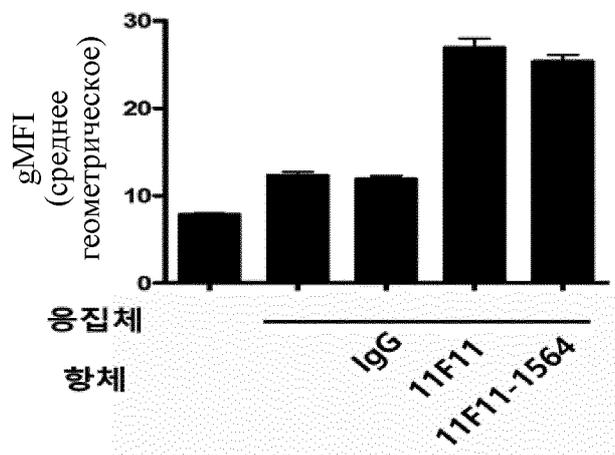


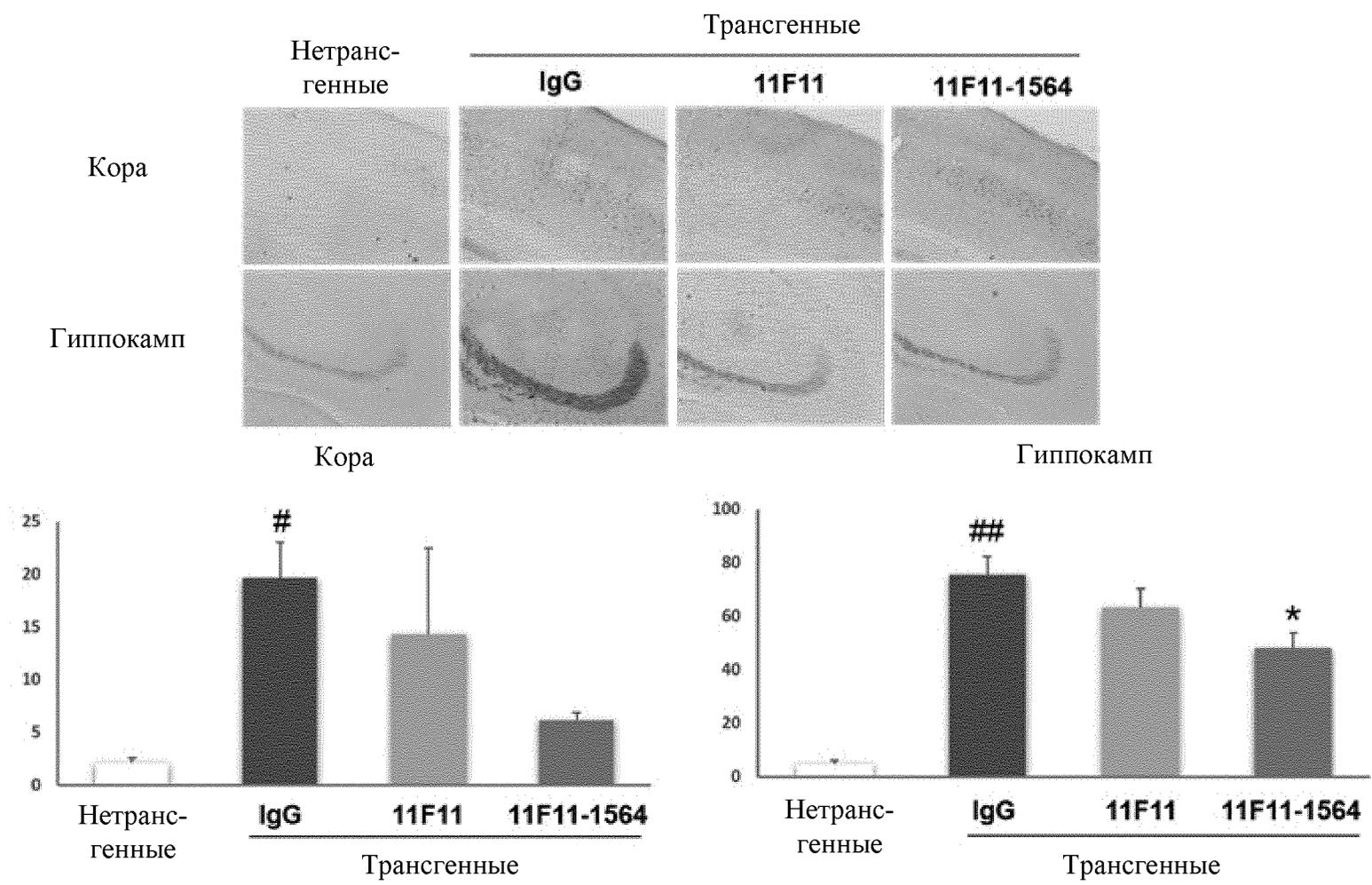
4-PFIT: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R ²
○ Plot#4 (ch11F11(-RD))_Конц-я vs ср.значение	0.013	0.898	201	2.68	1
□ Plot#1 (ch11F11-1564(-RD))_Конц-я vs ср.значение	-0.0288	0.789	0.644	2.84	1
△ Plot#2 (ch11F11-1564(-RD))_Только концентрация	0.029	0.942	0.904	2.82	0.999
◇ Plot#3 (hu11F11-1564(ver.2))_Конц-я vs ср.знач-е	-0.00338	0.84	0.649	2.88	1
● Plot#5 (hu11F11-1564(ver.3))_Конц-я vs ср.знач-е	-0.00109	0.812	0.687	2.96	0.999
■ Plot#6 (hu11F11-1564 (ver.3))_Только концентрация	0.0203	0.929	1.02	3.01	1

Опция подгонки по кривой – Фиксированное значение массы

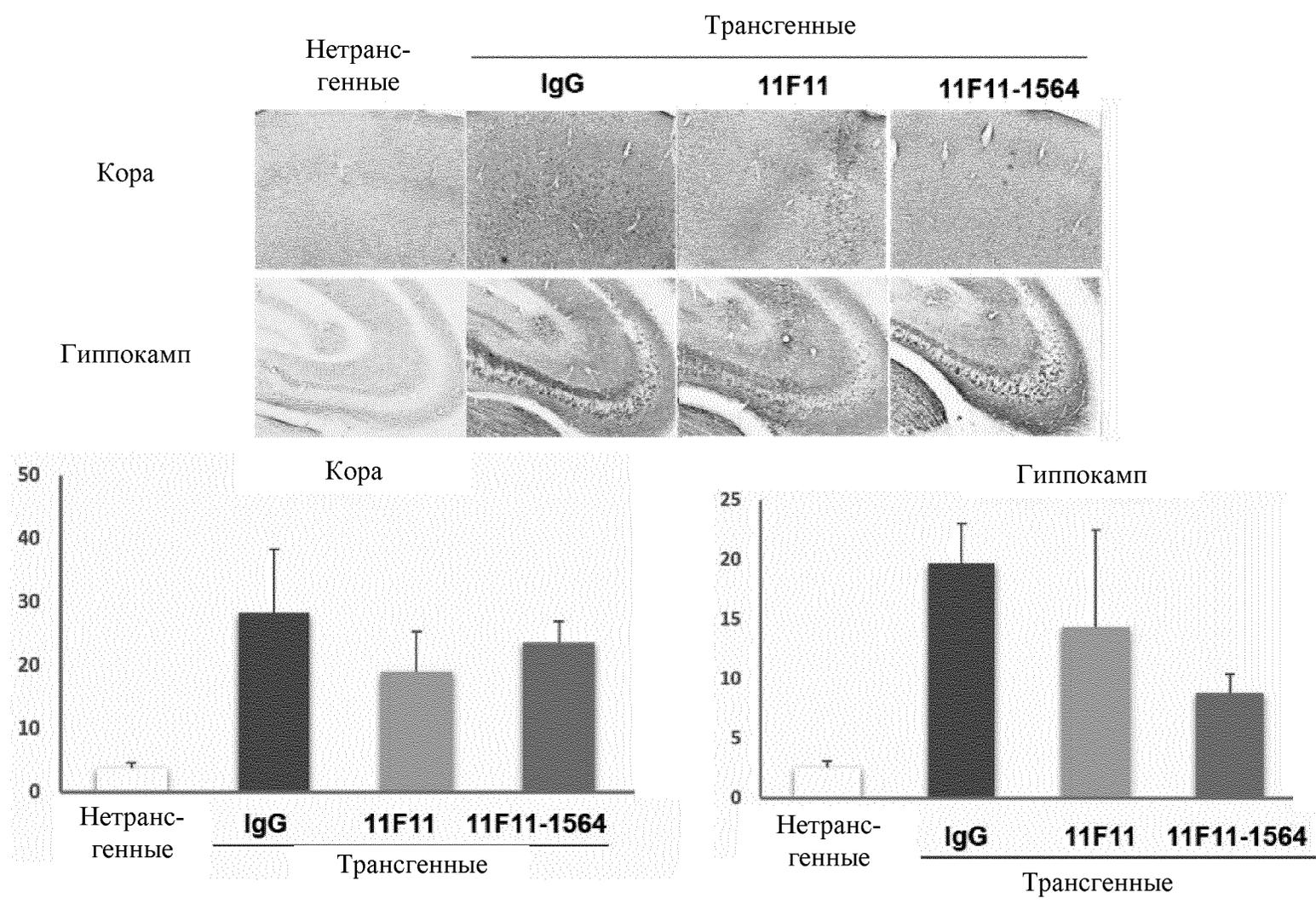
Фиг. 20e

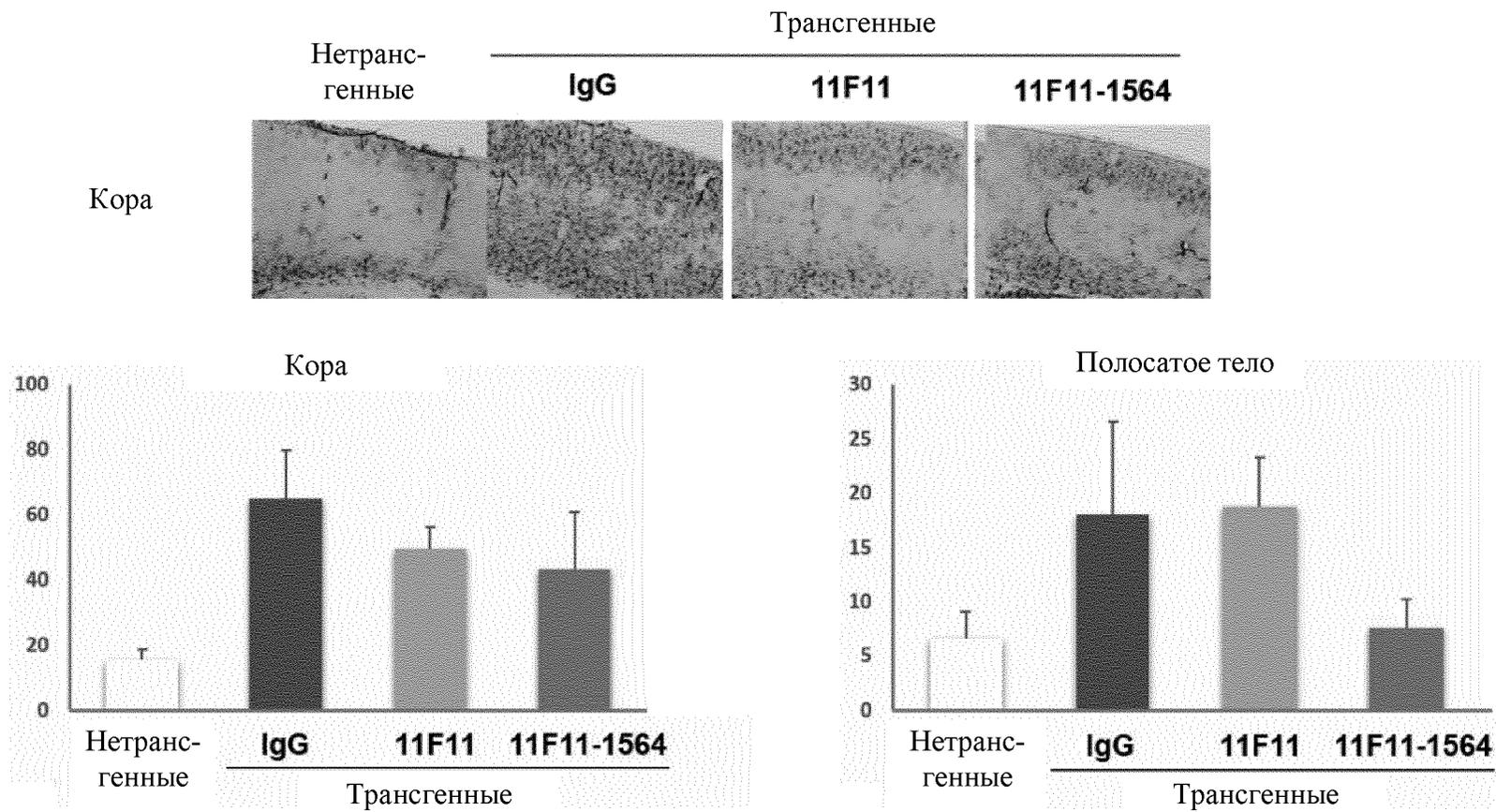




Фиг. 21а

Фиг. 21b

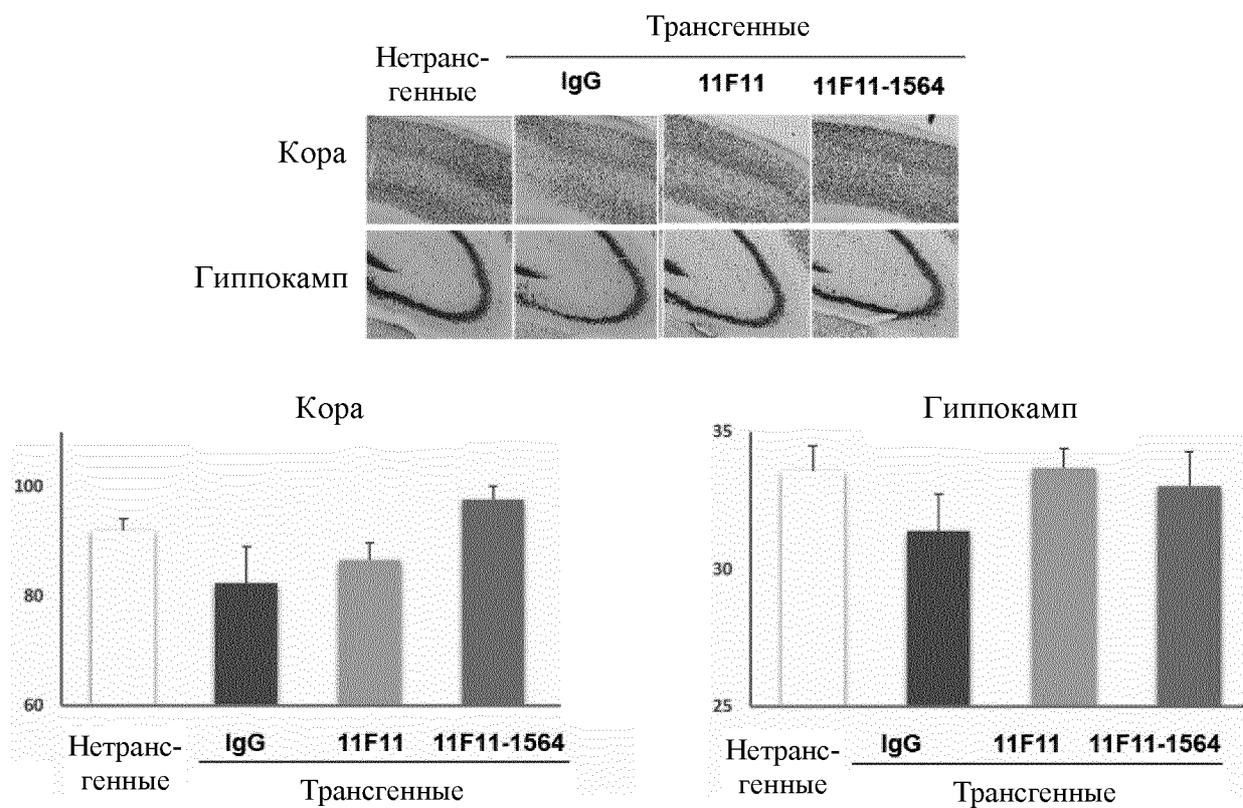




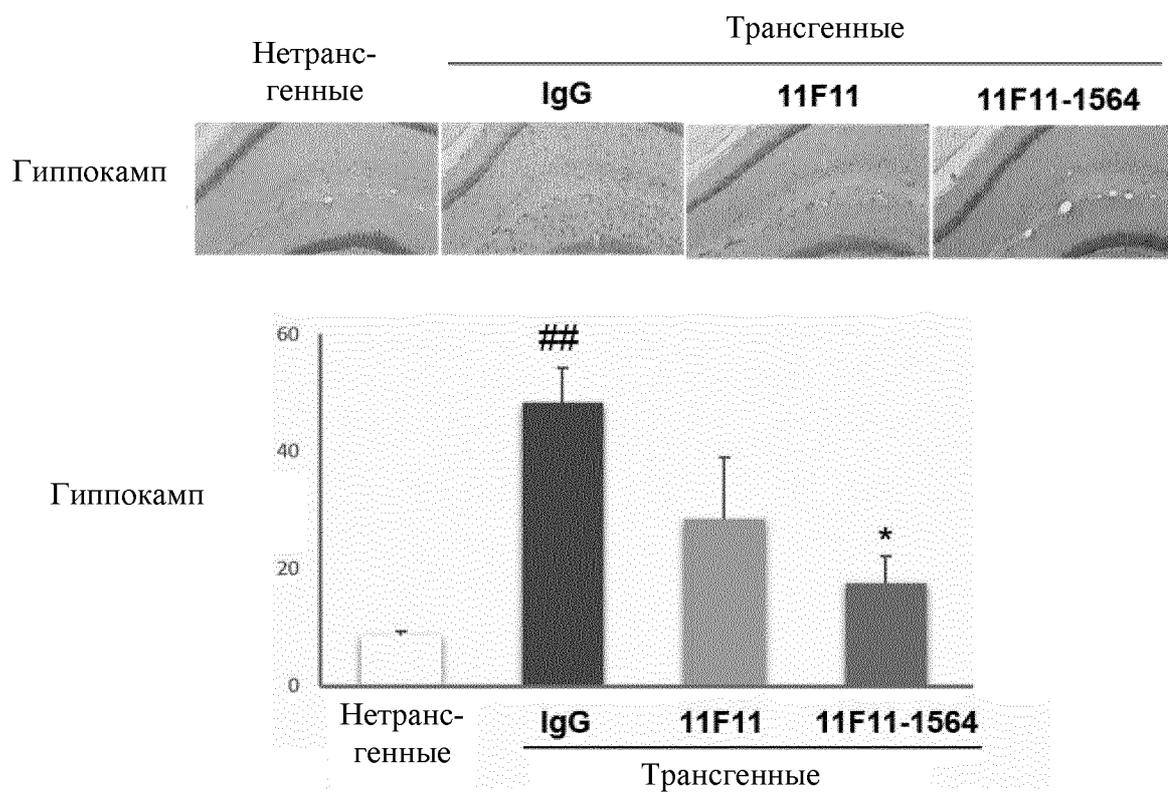
Фиг. 21c

Виспецифичное антитело к α -syn/IgG1R и его применение

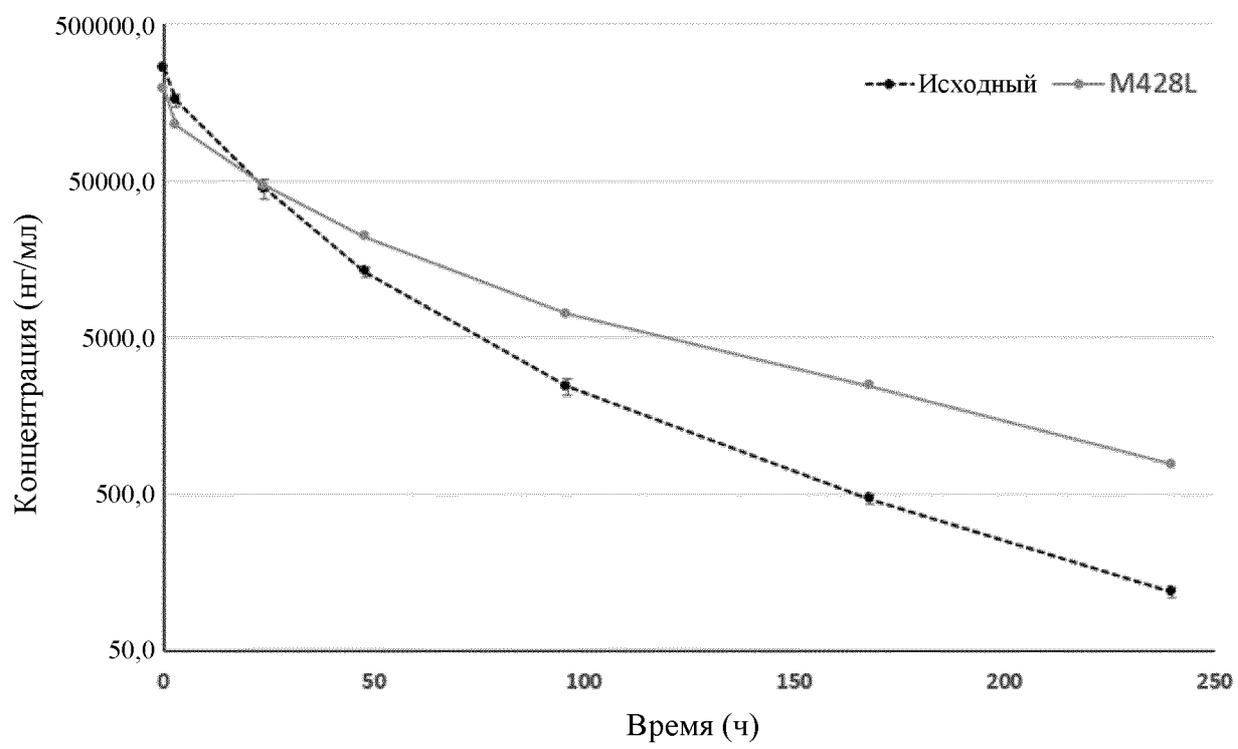
Фиг. 21d



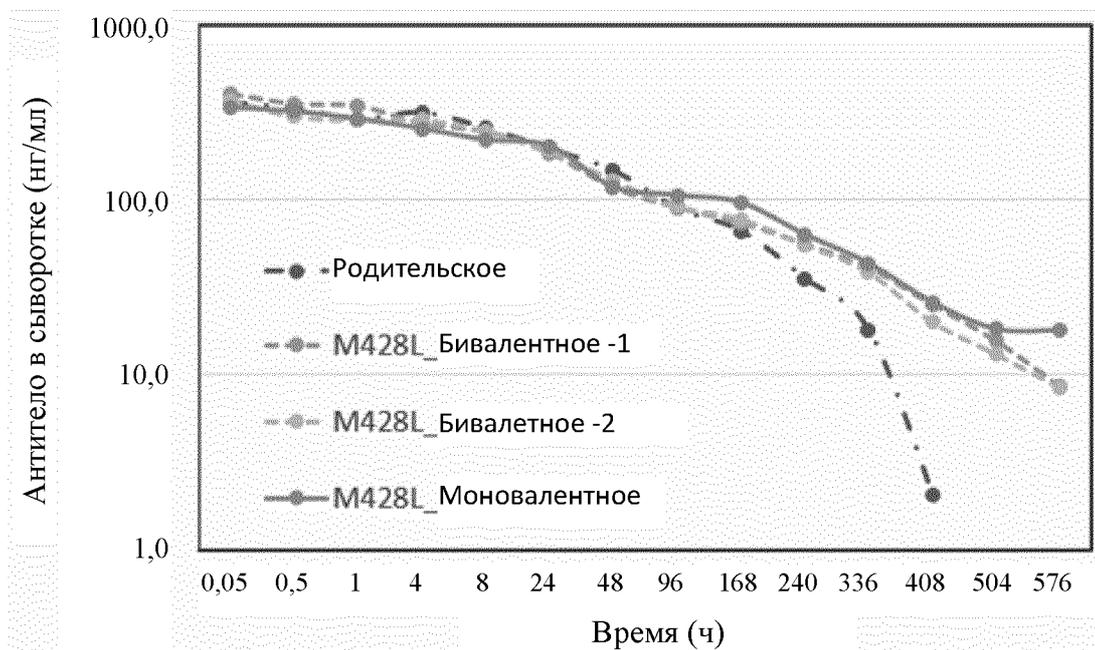
Фиг. 21e



Фиг. 22а

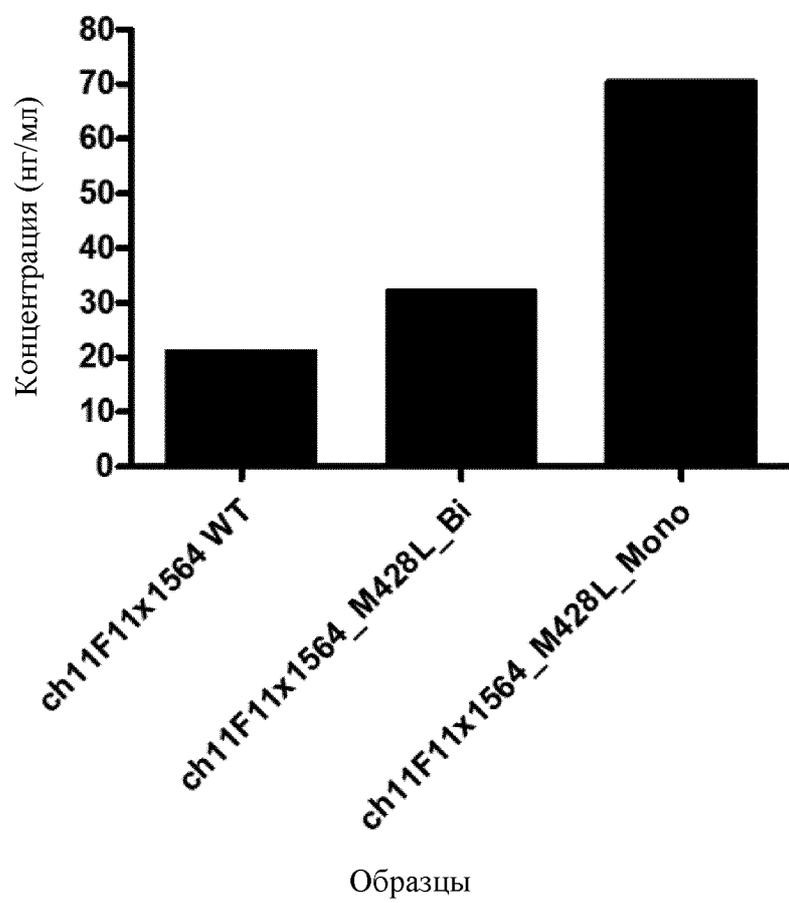


Фиг. 22b



	Период полувыведения (сутки)	Клиренс (мл/ч/кг)
Исходное	3,6	0,438
M428L_Бивалентное	5,1	0,37
M428L_Моновалентное	4,9	0,3155

Фиг. 22с



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/015953

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 28, 29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 28 and 29 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/015953

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i, A61K 47/68(2017.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28; A61K 39/395; A61K 51/00; C07K 16/00; C07K 16/18; C12P 21/08; G01N 33/53; A61K 47/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: alpha-synuclein, IGF1R, double specific antibody, heavy chain, light chain, variable region, CDR, alpha-synucleinopathy

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2012-0047274 A (ABBOTT LABORATORIES) 11 May 2012 See paragraphs [0010], [0011]; and claims 1, 3, 6, 13-15, 20.	1-27
A	KR 10-2015-0063447 A (PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED) 09 June 2015 See the entire document.	1-27
A	KR 10-2014-0125409 A (NEOTOPE BIOSCIENCES LIMITED) 28 October 2014 See the entire document.	1-27
A	US 9534044 B2 (UNITED ARAB EMIRATES UNIVERSITY) 03 January 2017 See the entire document.	1-27
A	US 2011-0014117 A1 (WANG, Y. et al.) 20 January 2011 See the entire document.	1-27

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 APRIL 2019 (30.04.2019)

Date of mailing of the international search report

30 APRIL 2019 (30.04.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/015953

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0047274 A	11/05/2012	AR 078087 A1	12/10/2011
		AU 2010-278947 A1	01/03/2012
		BR 112012002095 A2	01/09/2015
		CA 2769518 A1	03/02/2011
		CN 102791875 A	21/11/2012
		EP 2459729 A2	06/06/2012
		IL 217718 A	29/03/2012
		JP 2013-500721 A	10/01/2013
		MX 2012001262 A	22/05/2012
		RU 2012107526 A	10/09/2013
		SG 178148 A1	29/03/2012
		TW 201109438 A	16/03/2011
		US 2011-0044980 A1	24/02/2011
		UY 32808 A	28/02/2011
		WO 2011-014659 A2	03/02/2011
		WO 2011-014659 A3	21/04/2011
		ZA 201200666 B	30/07/2014
KR 10-2015-0063447 A	09/06/2015	AU 2013-329381 A1	16/04/2015
		AU 2013-329381 B2	06/09/2018
		AU 2018-271353 A1	20/12/2018
		BR 112015007882 A2	28/11/2017
		CA 2886254 A1	17/04/2014
		CN 104822389 A	05/08/2015
		CN 104822389 B	09/11/2018
		CN 109180812 A	11/01/2019
		EA 201590627 A1	30/07/2015
		EP 2903648 A2	12/08/2015
		EP 2903648 B1	21/11/2018
		ES 2701406 T3	22/02/2019
		HK 1212361 A1	10/06/2016
		IL 238192 A	31/05/2015
		JP 2016-500673 A	14/01/2016
		MX 2015003852 A	29/10/2015
		PH 12015500767 A1	08/06/2015
		PH 12015500767 B1	08/06/2015
		SG 11201502662 A	28/05/2015
		US 10081674 B2	25/09/2018
		US 2014-0127131 A1	08/05/2014
		US 2015-0259404 A1	17/09/2015
		US 2017-0152310 A1	01/06/2017
		US 2019-0062415 A1	28/02/2019
		US 9605056 B2	28/03/2017
		WO 2014-058924 A2	17/04/2014
		WO 2014-058924 A3	05/06/2014
WO 2014-058924 A9	17/07/2014		
ZA 201502213 B	27/07/2016		
KR 10-2014-0125409 A	28/10/2014	AU 2013-211874 A1	18/09/2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/015953

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		AU 2013-211874 B2	02/11/2017
		CA 2863953 A1	01/08/2013
		CA 2887063 A1	10/04/2014
		CA 2887064 A1	10/04/2014
		CA 2887064 C	11/07/2017
		CL 2014001984 A1	19/12/2014
		CN 104619724 A	13/05/2015
		CN 104619724 B	04/05/2018
		CN 108517010 A	11/09/2018
		EP 2807188 A1	03/12/2014
		HK 1204791 A1	04/12/2015
		IN 7149DEN2014 A	24/04/2015
		JP 2015-508062 A	16/03/2015
		JP 2018-148911 A	27/09/2018
		JP 6342333 B2	13/06/2018
		MX 2014008952 A	20/02/2015
		MX 360778 B	16/11/2018
		NZ 629296 A	24/06/2016
		PH 12014501685 A1	10/11/2014
		RU 2014134747 A	20/03/2016
		RU 2642262 C2	24/01/2018
		SG 11201404321 A	28/08/2014
		UA 115439 C2	10/11/2017
		US 10118960 B2	06/11/2018
		US 2013-0266517 A1	10/10/2013
		US 2014-0097195 A1	10/04/2014
		US 2014-0097197 A1	10/04/2014
		US 2015-0024433 A1	22/01/2015
		US 2015-0056187 A1	26/02/2015
		US 2016-0251416 A1	01/09/2016
		US 2018-0016329 A1	18/01/2018
		US 8790644 B2	29/07/2014
		US 9217030 B2	22/12/2015
		US 9234031 B2	12/01/2016
		US 9670273 B2	06/06/2017
		WO 2013-112945 A1	01/08/2013
		WO 2014-055872 A1	10/04/2014
		WO 2014-055925 A1	10/04/2014
		ZA 201406227 B	24/02/2016
US 9534044 B2	03/01/2017	CN 105121473 A	02/12/2015
		EP 2961774 A1	06/01/2016
		HK 1217107 A1	23/12/2016
		JP 2016-511254 A	14/04/2016
		JP 6261621 B2	17/01/2018
		KR 10-2016-0010402 A	27/01/2016
		US 10208111 B2	19/02/2019
		US 2014-0241984 A1	28/08/2014
		US 2014-0241987 A1	28/08/2014
		US 2017-0190765 A1	06/07/2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/015953

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 2014-132210 A1	04/09/2014
US 2011-0014117 A1	20/01/2011	WO 2009-005673 A1	08/01/2009